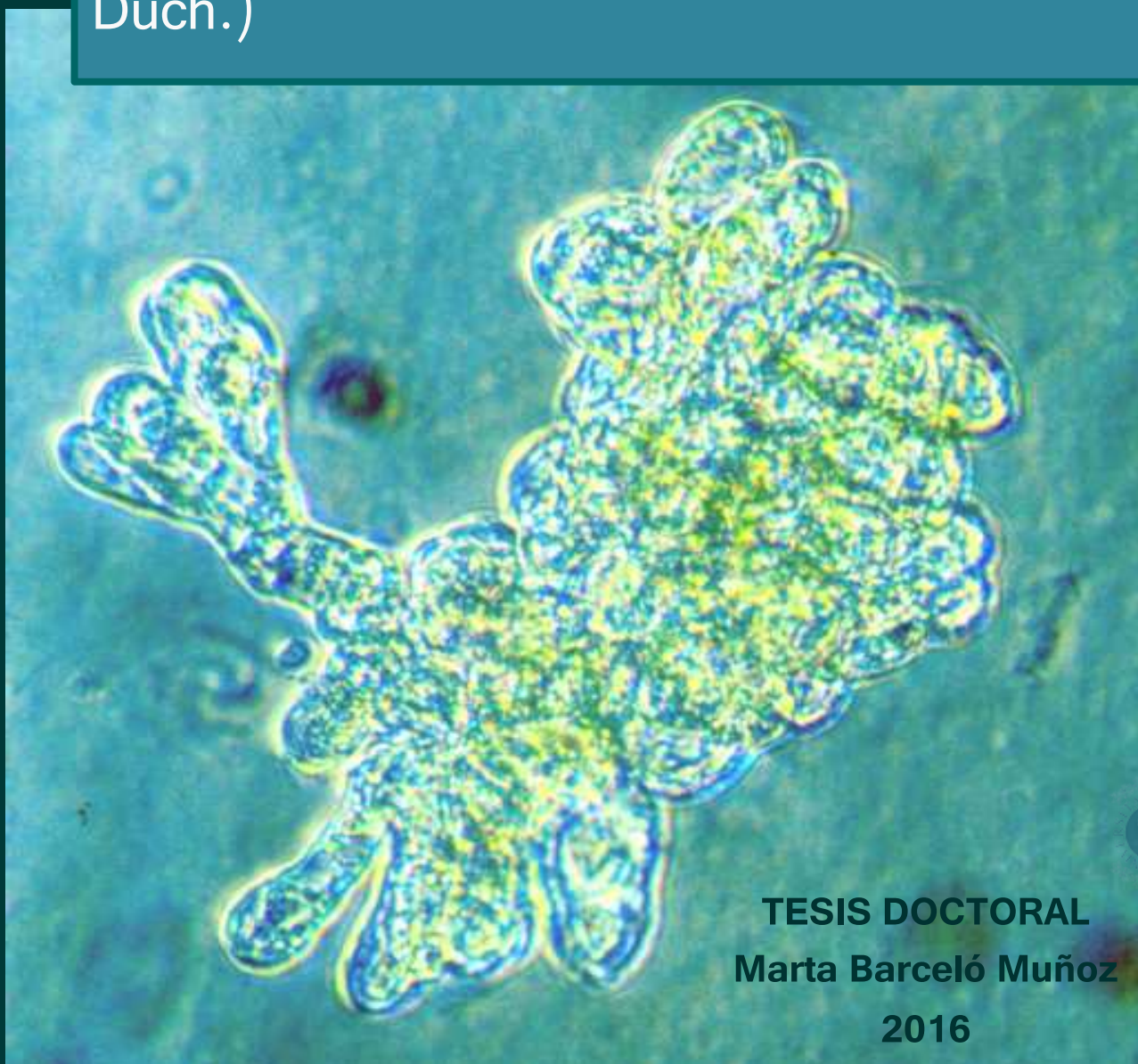


Universidad de Málaga. Facultad de Ciencias



Regeneración, transformación y variación somaclonal en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.)




TESIS DOCTORAL
Marta Barceló Muñoz
2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Marta Barceló Muñoz

 <http://orcid.org/0000-0002-5676-0856>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Memoria presentada por

Marta Barceló Muñoz

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga

Regeneración, transformación y variación somaclonal en fresa
(*Fragaria x ananassa* Duch.)

Directores: Dr. Fernando Pliego Alfaro

Dr. José Ángel Mercado Carmona

Departamento de Biología Vegetal

Área de Mejora y Biotecnología de Cultivos

Fisiología Vegetal

IFAPA-Centro de Málaga

Universidad de Málaga

Málaga, 2016

Fernando Pliego Alfaro, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga, y José Ángel Mercado Carmona, Profesor Titular del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga

INFORMAN:

Que, la Licenciada D^a Marta Barceló Muñoz ha realizado bajo nuestra dirección, en el IFAPA-Centro de Málaga, el trabajo titulado "Regeneración, transformación y variación somaclonal en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.)". La presente memoria recoge los principales resultados obtenidos y se presenta para su defensa pública para aspirar al grado de Doctora

Para que conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, extendemos el presente informe autorizando la defensa.



Dr. Fernando Pliego Alfaro

En Málaga, a 8 de Enero de 2016



Dr. José Ángel Mercado Carmona



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, manifestar mi más profundo agradecimiento a Fernando Pliego y a Jose Ángel Mercado, por su valiosa y constante ayuda que han hecho posible la elaboración de este trabajo. He sido muy afortunada al tener la oportunidad de trabajar con ellos. A Fernando, mi director de tesis, quisiera agradecerle muy especialmente su aporte continuo de conocimiento, así como su paciencia y amabilidad en todo momento. He tenido la suerte de poder trabajar a su lado durante muchos años; y espero que siga siendo así por mucho tiempo más. Durante todo este periodo, siempre ha estado ahí, dispuesto a ayudar y a colaborar en la elaboración de este trabajo, su generosidad a la hora de compartir conocimientos y experiencia, así como su ejemplo constante, han sido un modelo incuestionable a seguir, ojalá hubieran más personas así. También quiero mencionar mi agradecimiento a José Ángel, mi codirector de tesis, por el tiempo dedicado a ayudarme y orientarme muy especialmente en la etapa final de este trabajo, aunque siempre estuvo ahí. Su sentido práctico, disposición y buen hacer, así como su humildad, han hecho mucho más agradable el logro de este trabajo, lo cual agradezco profundamente.

Quisiera agradecer muy especialmente a todos mis compañeros del IFAPA su amistad, así como, su ánimo y colaboración en todo momento. Todos ellos son para mí una gran familia. Desde Conchi cuidándome con sus desayunos o Pepa regalándome sus buenos días y su alegría nada más llegar al Centro; a Dani, Antonio, Baltasar, Pepillo y algunos más que ya no están, por su amabilidad y simpatía, dispuestos siempre a ayudarme en lo que hiciera falta. Y como no Araceli, muchas gracias por haber confiado siempre en mí. Tu categoría humana y

científica, tu ejemplo e innumerables ofertas de ayuda, así como tu apoyo incondicional en todo momento, son en gran medida responsables de que este trabajo se haya podido realizar. A mis compañeros más cercanos del laboratorio, Isa, Ely, Clara, Amalia, Adela, Borja, Josefa y J.Luis, por aguantarme y ayudarme todos los días; y a los que ya se fueron, Yanet, Isa, Laura, Sonia, Inma...; a Mayte, a Carmen Soria y a Carmen Villalobos, por ser como son, siempre dispuestas a colaborar y a escuchar; y por supuesto, a mi compañera y amiga incondicional Pepa, siempre sonriendo y cuidándome las fresas en el invernadero, o lo que hiciera falta. A Pepe Sevilla, por su amabilidad y aclaraciones cuando lo necesité, a Elsa por su ayuda en los últimos momentos. Al resto de compañeros de Entomología, Patología, Mejora y Bioquímica. Y por supuesto, a todo el personal de Administración, a todos ellos muchas gracias.

A Juliet, a la que considero amiga, por todo lo que me has enseñado y transmitido, por tu confianza y ánimo y por saber que estás ahí.

No quisiera olvidar mi gratitud hacia los directores del Centro IFAPA, porque han sido varios, muy especialmente a José Manuel López Aranda, antiguo compañero de la fresa, cuya valía profesional y humana es indiscutible. Por estar siempre dispuesto a ayudarme cuando lo he necesitado, por contarme tantas historias y anécdotas, y por lo mucho que hemos trabajado y disfrutado. Gracias Mane.

A todo el departamento de Biología Vegetal, Área de Fisiología Vegetal, por su generosidad y simpatía, abriéndome las puertas desde el primer día y acogiéndome como una más. A Sergio y a Antonio por su amabilidad en todo

momento, a Candela por el tiempo compartido en las calurosas jornadas en el invernadero del IFAPA. A Nieves, mi compañera de alegrías, penas, estrategias de trabajo y escritura en estos últimos meses. Su apoyo incondicional en cualquier momento, han convertido los días difíciles en posibles y los fáciles en divertidos. Sin tí, todo habría resultado mucho más duro, por tú generosidad y amistad, siempre te estaré agradecida.

También quisiera recordar a las Dras. Anita Wallin y Mary Nyman, de la Universidad de Uppsala, Suecia. Siempre recordaré su valía personal y científica, así como su amistad.

Al Dr. Carlos López Encina, también un amigo, por su ayuda y su apoyo siempre que lo he necesitado.

A todas mis amigas, Marta, Marga, Bea, Sole, Rocio L., Rocio H. y Ana, algunas de ellas desde que teníamos seis años. Por estar siempre a mi lado, tanto en los momentos buenos como en los malos, y por vuestro ánimo y aliento continuo.

A mis hermanos y familia política, cuyo interés me animaron a continuar.

Por último quiero dar las gracias a los que más cerca han estado siempre de mí, a Jose cuyo apoyo constante e incondicional desde el primer hasta el último día me ha animado a seguir, porque sin tú ayuda tanto en el plano personal como en el familiar, no hubiera podido concluir este trabajo. Gracias por ocuparte de todo y de todos, muy especialmente en estos últimos meses. A Carlos, Marta y Nacho, a los tres agradecerlos enormemente vuestra confianza, presencia y paciencia por el

tiempo robado. A Isabel, una más de la familia, siempre ayudando aunque no se lo pida, siempre estaré agradecida por hacer fácil lo difícil. A Araceli, gracias otra vez porque sin tí no se hubiera escrito este trabajo. A mi padre aunque ya no esté, quien siempre quiso que llegase este momento; y a mi madre, por ser un ejemplo constante a seguir, por no dejar de confiar en mí ni un sólo instante de su vida, y por ayudarme y alentarme en todo momento. Gracias por hacer posible que creciera, progresara y realizara este trabajo.

A mis padres

“No dejes de intentarlo sólo porque
la perfección se te escape”

BKS Iyengar





Fragaria vesca, 373.

Índice

ÍNDICE

Abreviaturas

Resumen

CAPÍTULO I: Introducción

I.1 Descripción de la especie: aspectos históricos. Características genéticas y botánicas	3
I.2 Importancia del cultivo	6
I.3 Mejora de la fresa	7
I.3.1 Mejora tradicional	9
I.3.2 Mejora de la fresa mediante aproximaciones biotecnológicas	10
I.3.2.1 Regeneración <i>in vitro</i> : Organogénesis adventicia	10
I.3.2.2 Transformación genética	12
I.3.2.3 Aislamiento y cultivo de protoplastos	14
I.3.2.4 Variación somaclonal	16

CAPÍTULO II: Objetivos

II. Objetivos	21
---------------	----

CAPÍTULO III: Regeneración vía adventicia en los cultivares de fresa Chandler y Carisma. Puesta a punto de un sistema eficiente de transformación genética en Carisma vía *Agrobacterium tumefaciens* y evaluación del material obtenido

III.1 Introducción	25
III.2 Materiales y métodos	28
III.2.1 Regeneración adventicia	28
III.2.1.1 Cultivar Chandler	28
III.2.1.2 Cultivar Carisma	30

III.2.1.3 Toma de datos	31
III.2.2 Aclimatación y evaluación agronómica de las plantas del cv. Carisma obtenidas vía organogénesis adventicia	31
III.2.3 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> del cv. Carisma	33
III.2.4 Aclimatación y evaluación morfológica de las líneas transgénicas del cv. Carisma	37
III.3 Resultados	38
III.3.1 Regeneración adventicia	38
III.3.1.1 Cultivar Chandler	38
III.3.1.2 Cultivar Carisma	42
III.3.2 Aclimatación y evaluación agronómica de las plantas del cv. Carisma obtenidas vía organogénesis adventicia	44
III.3.3 Transformación del cv. Carisma mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
III.3.4 Aclimatación y evaluación morfológica de las líneas transgénicas de Carisma	59
III.4 Discusión	72
III.4.1 Regeneración adventicia	72
III.4.2 Valoración agronómica de los regenerantes de Carisma	74
III.4.3 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> del cv. Carisma	81
III.4.4 Evaluación morfológica de las líneas transgénicas de Carisma	85
III.V Conclusiones	88
CAPÍTULO IV: Caracterización del papel del gen <i>Fxacad1</i> , que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa, en el proceso de	

maduración del fruto de fresa

IV.1 Introducción	93
IV.2 Materiales y métodos	96
IV.2.1 Material vegetal y transformación genética	96
IV.2.2 Evaluación agronómica de las plantas transgénicas	97
IV.2.3 Extracción de ARN	98
IV.2.4 Análisis de expresión de <i>Fxacad1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR)	98
IV.2.5 Análisis estadístico	99
IV.3 Resultados	99
IV.3.1 Obtención de plantas transgénicas	99
IV.3.2 Primera evaluación fenotípica de las líneas transgénicas	100
IV.3.3 Análisis molecular de las líneas Cad	104
IV.3.4 Evaluación fenotípica de las líneas Cad seleccionadas	105
IV.4 Discusión	111
IV.5 Conclusiones	118

CAPÍTULO V: Aislamiento y cultivo de protoplastos en el cultivar de fresa Chandler. Evaluación morfológica de los protoclonos obtenidos

V.1 Introducción	121
V.2 Materiales y Métodos	125
V.2.1 Fuente de material vegetal	127
V.2.2 Aislamiento y purificación de los protoplastos	128
V.2.2.1 Influencia de la concentración de sacarosa y el percoll en la recuperación de protoplastos viables	129
V.2.3 Cultivo y regeneración de plantas	129
V.2.3.1 Influencia de la duración del cultivo en agarosa antes de la adición de medio líquido.	130

V.2.3.2 Efecto de diferentes densidades de cultivo en medio con BA	130
ó TDZ	
V.2.3.3 Efecto del medio de cultivo en la regeneración de plantas	130
V.2.4 Aclimatación	131
V.2.5 Comportamiento de los protoclonos en vivero	133
V.2.6 Comportamiento de los protoclonos en campo de fructificación	135
V.2.7 Estabilidad genética de los protoclonos	138
V.3 Resultados	139
V.3.1 Fuente de material	139
V.3.1.1 Efecto de la duración del último subcultivo en el medio para	140
inducir hiperhidricidad	
V.3.2 Aislamiento y purificación de los protoplastos	141
V.3.2.1 Influencia de la concentración de sacarosa y el percoll en la	141
recuperación de protoplastos viables	
V.3.3 Cultivo y regeneración de plantas	143
V.3.3.1 Influencia de la duración del cultivo en agarosa antes de la	143
adición de medio líquido	
V.3.3.2 Efecto de diferentes densidades de cultivo en medio con BA	144
y TDZ	
V.3.3.3 Efecto del medio de cultivo en la regeneración de plantas	145
V.3.4 Aclimatación	149
V.3.5 Comportamiento de los protoclonos en vivero (F0)	149
V.3.6 Comportamiento de los protoclonos en el campo de fructificación	152
(F1)	
V.3.6.1 Caracteres morfológicos de las plantas	152
V.3.6.2 Fructificación	155
V.3.6.3 Morfología de los frutos	157

V.3.6.4 Dureza media de los frutos maduros	160
V.3.7 Estabilidad genética de los protoclonos	161
V.4 Discusión	162
V.4.1 Pretratamiento de la fuente de material	163
V.4.2 Aislamiento y purificación de los protoplastos	164
V.4.3 Cultivo y regeneración de plantas	166
V.4.3.1 Densidad de cultivo	167
V.4.3.2 Formación de microcallos	168
V.4.4 Evaluación de los protoclonos y estabilidad genética	169
V.5 Conclusiones	173
 CAPÍTULO VI: Discusión general	
VI.1 Regeneración vía organogénesis adventicia en los cultivares de fresa Chandler y Carisma. Puesta a punto de un sistema eficiente de transformación genética en Carisma vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y evaluación del material obtenido	177
VI.1.1 Regeneración de los cvs. Chandler y Carisma mediante organogénesis adventicia	177
VI.1.2 Evaluación morfológica y agronómica de los regenerantes de Carisma	178
VI.1.3 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> del cv. Carisma	180
VI.1.4 Evaluación morfológica de las líneas transgénicas de Carisma	182
VI.2 Caracterización del papel del gen <i>Fxacad1</i> , que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa, en el proceso de maduración del fruto de fresa	184
VI.3 Aislamiento y cultivo de protoplastos en el cultivar de fresa Chandler. Evaluación morfológica y agronómica de los protoclonos obtenidos y estabilidad genética	188
VI.3.1 Aislamiento y cultivo de protoplastos	188

VI.3.2 Evaluación morfológica y agronómica de los protoclones obtenidos y estabilidad genética	190
---	-----

CAPÍTULO VII: Conclusiones

VII. Conclusiones	195
-------------------	-----

CAPÍTULO VIII: Bibliografía

VIII. Bibliografía	201
--------------------	-----

Anexos: Publicaciones

Anexo I

Anexo II



Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIA: ácido indol-3 acético

AIB: ácido 3-indol-butírico

ANA: ácido naftalenacético

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

BA: 6-benciladenina

Cad: líneas de plantas de fresa transformadas conteniendo la secuencia codificante del gen *Fxacad1*

CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa

CaMV35S: virus del mosaico de la coliflor

CCR: cinamil alcohol reductasa

ChFaM: marcadores microsatélites para el cultivar Chandler (*Fragaria* x ananassa Duch.)

CIELAB: CIE=modelo cromático usado para describir los colores que pueden ser percibidos por el ojo humano. LAB= espacio de color tridimensional donde L* es luminosidad de negro a blanco, a* va de rojo a verde y b* es la gradiente del azul.

CPW: medio de Banks y Evans, 1976

Cv: cultivar

DNase I: endonucleasa

dNTPs: deoxinucleósido trifosfato

DPAC: programa análisis protoplastos

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EST-SSR: microsatélites desarrollados a partir de fragmentos de secuencias expresadas

F0: generación madre

F1: primera generación hija

F2: segunda generación hija

GUS: β -glucuronidasa

HBO: lámpara de mercurio utilizada en microscopía e inspección visual

IFAPA: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica

K3: medio de Menzel y col. (1981)

KG1: vidrios incoloros con alta transmisión en la absorción visible y eficaces en los filtros de protección del calor.

LSD: mínima diferencia significativa

milliQ: agua ultrapura

N₃₀K-BA: medio de organogenesis para fresa (Barceló 1998)

nptII: neomicina fosfotransferasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PVP: polivinilpirrolidona

QRT-PCR: PCR en tiempo real

RNAi: ARN interferente

RNase: ribonucleasa

TDZ: tidiazurón

W5: medio de Menzel y col. (1981)

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

8p-m: medio de cultivo 8p modificado por Glimelius y col. (1986)



Resumen

La fresa cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una planta cuyo fruto es muy apreciado y que está presente en la mayoría de las áreas cultivables del mundo, incluida España, y en particular Andalucía. En este trabajo, se han utilizado distintas aproximaciones para abordar su mejora mediante métodos biotecnológicos. Inicialmente, se estableció un protocolo de regeneración, a partir de explantos de hoja, que incluye el precultivo en condiciones de oscuridad y posterior transferencia a condiciones de luz ($40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en presencia de 2 mg.l^{-1} BA y $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ AIB. Este protocolo ha permitido regenerar plantas de los cvs. Chandler y Carisma, así como abordar la transformación genética de Carisma con el gen GUS. La evaluación, en condiciones de invernadero, de 16 somaclones de Carisma, procedentes de sucesos independientes de regeneración, mostró la existencia de una gran variabilidad fenotípica; así, la mayoría de ellos tenían una superficie aérea inferior a la del control micropropagado; por otra parte, la capacidad de fructificación también fue muy variable y sólo la mitad de las líneas evaluadas mostraron una producción similar a la del control. La evaluación en invernadero de 26 líneas transgénicas independientes dio unos resultados similares a los obtenidos con el material regenerado no transgénico, lo que parece indicar que la variabilidad observada en líneas transgénicas tiene su base en el proceso de regeneración adventicia más que en el efecto de inserción del transgen.

El protocolo de regeneración desarrollado también se ha utilizado para obtener plantas del cv. Chandler transformadas con el gen *Fxacad1* que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa, implicada en la síntesis de lignina y cuya expresión se ha relacionado con la firmeza del fruto de fresa.

En la mayoría de las líneas se produjo una cosupresión del gen, alcanzándose niveles de silenciamiento en frutos maduros superiores al 90%, lo que no afectó al crecimiento de la planta ni, en general, a la calidad de los frutos. La firmeza de fruto fue ligeramente inferior al control en la mayoría de las líneas, si bien no se encontró correlación entre el nivel de expresión del gen *Fxacad1* y la firmeza. Los resultados obtenidos no parecen indicar que *Fxacad1* tenga un papel relevante en la textura del fruto de fresa, pudiendo estar involucrado en otros aspectos del proceso de maduración, como son los relacionados con el aroma.

Finalmente, se ha optimizado un protocolo para la obtención y cultivo de protoplastos, así como para la regeneración de plantas, en el cultivar Chandler. El estado fisiológico de la fuente de material y la calidad de los protoplastos obtenidos son críticos, más importantes incluso que las propias condiciones de cultivo. Se ha observado una gran variabilidad morfológica en el material obtenido, tras la evaluación agronómica en condiciones de vivero y campo, fundamentalmente en hábito de crecimiento, capacidad de estolonado, número de folíolos en hoja, capacidad de fructificación y forma de frutos; sin embargo, el nivel de ploidía, cuantificado en algunos de los protoclones, siempre fue idéntico al del control, aunque sí aparecieron diferencias a nivel de marcadores microsatélites.



CAPÍTULO I

Introducción

I.1 Descripción de la especie: aspectos históricos. Características genéticas y botánicas

La fresa pertenece a la familia de las Rosáceas (*Rosaceae*), sub-Familia *Potentilloideae*, teniendo a *Duschenea* y *Potentilla* como parientes cercanos. Linneo eligió la palabra latina “fraga” (fresa) como un derivado para el nombre del género. Los poetas romanos Virgilio y Ovidio ya mencionaban a “fraga” en sus escritos. El Senador Romano Cato (234-149 a.c) hizo alusión a los usos medicinales de la fresa; sin embargo, posteriormente no aparece referencia alguna de esta especie, ni en escritos griegos ni romanos sobre agricultura. En el siglo XII, el abad Saint Hildegard von Binger, declaró a las fresas no aptas para el consumo porque crecían a lo largo de los caminos, donde las serpientes y sapos trepaban libremente sobre ellas; estas declaraciones tuvieron tanto impacto sobre las personalidades políticas de la época, que ellos también disuadieron a la población de su consumo. Estas creencias se mantuvieron durante varios años entre los europeos, hasta que, a mediados del siglo XVIII, Charles Linnaeus acabó con esta superstición mediante una dieta basada sólo en fresas para demostrar que eran comestibles (Darrow, 1966).

El género *Fragaria* incluye más de 20 especies, clasificadas en cuatro grupos en función de su nivel de ploidía: diploides, tetraploides, hexaploides y octoploides, todas ellas con un número cromosómico básico de 7. Actualmente, la especie cultivada predominante es *Fragaria x ananassa* Duch., híbrido octoploide, hermafrodita y con un número cromosómico de 56. Su origen es probablemente una de las historias más sorprendentes de todas las especies cultivadas. *Fragaria x ananassa*, resultó de la hibridación fortuita entre dos especies del Nuevo Mundo, *F. chiloensis* y *F. virginiana*, ocurrida en un jardín botánico europeo hace aproximadamente 250 años (Darrow, 1966;

Wilhelm y Sagen, 1974). La especie silvestre *F. virginiana*, nativa de Canadá y Estados Unidos, llegó a Europa a finales de 1600 por vías desconocidas y presentaba frutos muy pequeños y blandos, mientras que *F. chiloensis* llegó a Francia en 1714 gracias a Francois Frezier, un oficial de la armada francesa enviado a Chile, que descubrió cómo los nativos cultivaban *F. chiloensis* en Concepción. En su desconocimiento, Frezier trajo únicamente plantas de *F. chiloensis* femeninas, por lo que ésta no pudo expresar su verdadero potencial hasta que, tiempo después, se descubrió a *F. virginiana* como un polinizador eficaz. Los primeros híbridos de *Fragaria x ananassa* aparecen alrededor de 1750 en Brest, Francia.

En 1817, Thomas A. Knight, inicia un programa de mejora utilizando *F. virginiana* y *F. chiloensis*, obteniendo los cultivares “Downton” y “Elton”. La industria de la fresa comercial comienza en Estados Unidos alrededor de 1800 con una selección nativa de *F. virginiana*, no utilizándose los híbridos importados hasta 1840. Existen asimismo otras dos especies silvestres comerciales, *Fragaria vesca* y *Fragaria moschata*, pero en mucha menor escala.

La planta de fresa tiene apariencia herbácea (Figura 1), aunque en realidad es una especie leñosa que posee tallos rastreros y cónicos denominados coronas, con estolones, hojas pecioladas con dos estípulas en su base, vellosas, dispuestas en roseta, divididas en tres segmentos aovados y con dientes gruesos en el margen; flores pedunculadas, blancas o amarillentas, solitarias o en corimbos poco nutridos; fruto casi redondo, algo apuntado, rojo, succulento y fragante, y un sistema radicular fasciculado.



Figura 1. Dibujo de plantas de fresa silvestre (*Fragaria vesca*). Otto Wilhelm Thomé, 1885. Fuente: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Gera, Alemania.

La fresa es muy apreciada por su delicado sabor, aroma y características nutritivas. La composición del fruto maduro es aproximadamente un 90% de agua y un 10% de sólidos solubles (Hemphill y Martin, 1992), siendo muy alto el contenido en vitamina C; así, una ración de unos 10 frutos contiene los requerimientos nutricionales recomendados de esta vitamina (Maas y col., 1996). Los principales azúcares en fresa son glucosa y fructosa. El ácido cítrico representa el 88% del total de ácidos; además, su contenido en ácido elágico y flavonoides es alto, teniendo efectos claramente beneficiosos para la salud, por la disminución de los riesgos cardiovasculares así como de las enfermedades inflamatorias crónicas. Por otra parte y aunque

aún queda mucho por conocer, estudios en algunos compuestos fitoquímicos de la fresa han revelado su acción como anticancerígenos, además de su potencial sobre el sistema inmune, concretamente en las reacciones alérgicas y en el asma, así como en la prevención de la degeneración cerebral asociada a la edad en el ser humano (Hannum, 2004).

I.2 Importancia del cultivo

La fresa cultivada es uno de los pequeños frutos más valorados y cultivados en todo el mundo, teniendo especial importancia agronómica en España, quinto productor mundial tras China, Estados Unidos, México y Turquía. La costa de Huelva representa la principal zona fresera de Europa con unas 8.000 Ha en monocultivo y una producción en torno a las 260.000 Tm anuales.

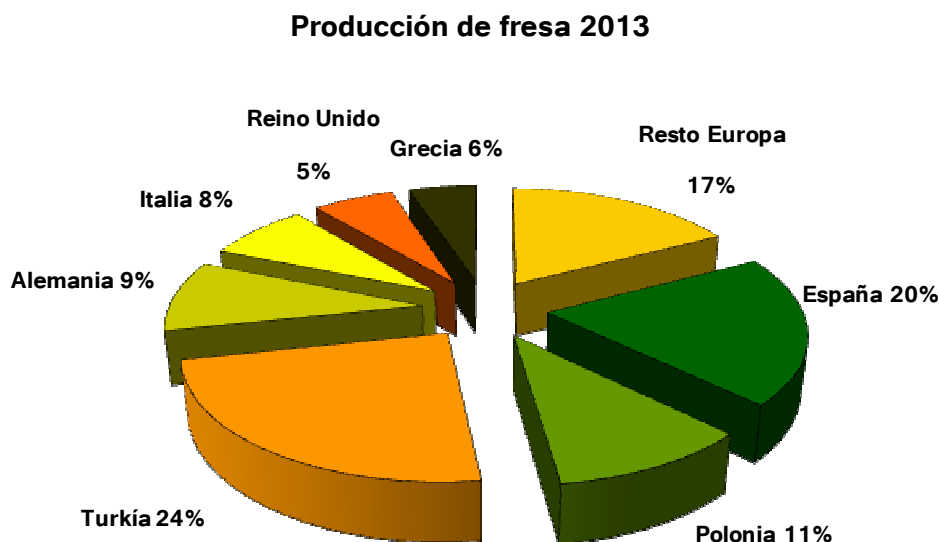


Figura 2. Distribución de la producción Europea de la fresa correspondiente al año 2013. Datos provenientes de European Commission Eurostat. (<http://ec.europa.eu/eurostat>).

En 2013, España fue el segundo productor de fresa en Europa, con el 20% de la producción (Figura 2), tras Turquía con un 24%, y seguida por Polonia con un 11%, pero estos dos últimos países con un área de cultivo considerablemente mayor.

Sus cualidades alimentarias tanto para el consumo en fresco como para procesado industrial, además de sus claros beneficios para la salud, hacen que la demanda de este producto a nivel internacional se incremente con el paso del tiempo. Por otra parte, además de su valor económico, tiene importancia como modelo en estudios fisiológicos del desarrollo y crecimiento de frutos no climatéricos (Manning, 1994).

La fresa se incluye en el grupo de frutos blandos, caracterizados por sufrir un drástico reblandecimiento al final de su maduración, pudiendo adquirir incluso una consistencia semilíquida (Manning, 1993). Esta pérdida de firmeza constituye la principal causa de disminución de calidad de los frutos, limitando en gran medida la vida postcosecha de esta especie. El hecho de que la mayor parte de la producción española se destine a la exportación y de que la fresa sea un fruto que madura rápidamente, hacen que la búsqueda de métodos que alarguen el periodo de postcosecha tenga especial relevancia, ya que entre un 5-25% de la producción se pierde cada año debido al excesivo reblandecimiento del fruto y a infecciones por patógenos fúngicos y bacterianos.

1.3 Mejora de la fresa

La fresa es un cultivo muy sensible a la autogamia (Morrow y Darrow, 1952), y como los genotipos son altamente heterozigóticos y se pueden reproducir mediante estolones, normalmente los programas de mejora no han desarrollado cultivares híbridos utilizando líneas autofecundadas (Hummer y

Hancock, 2009).

Desde las primeras investigaciones iniciadas en Inglaterra en el siglo XIX por Thomas A. Knight (Darrow, 1966), han sido muchos los trabajos encaminados hacia la obtención de nuevos cultivares de fresa. En esta línea, Bringhurst y Voth (Universidad de California, Davis), a mediados del siglo pasado, introdujeron un gran número de importantes cultivares adaptados al clima Mediterráneo, como es el caso de Chandler (1983) o Camarosa (1992) (Hummer y Hancock, 2009).

En el siguiente diagrama (Figura 3), se muestra un esquema de la mejora de esta especie, que incluye además de la mejora tradicional, la mejora mediante aproximaciones biotecnológicas (regeneración vía organogénesis, transformación genética y cultivo de protoplastos) como complemento a la mejora clásica.

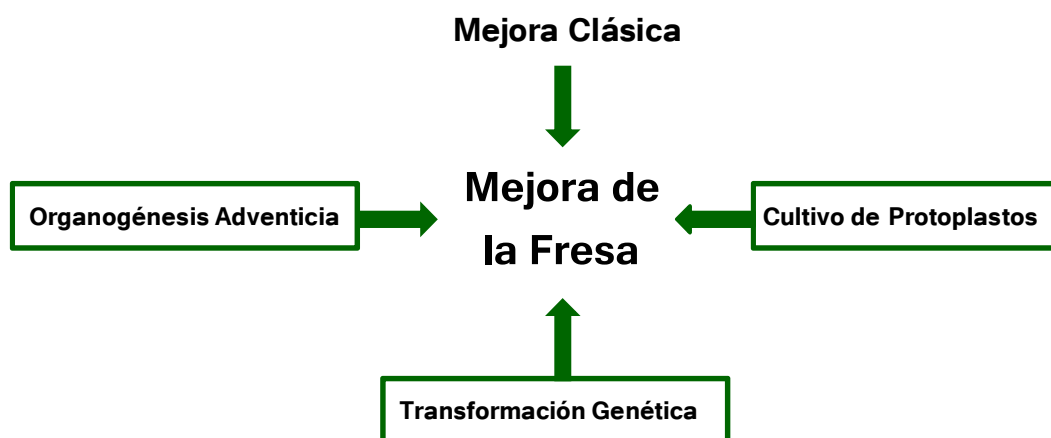


Figura 3. Esquema de las diferentes estrategias utilizadas en la mejora de la fresa

I.3.1. Mejora tradicional

Los cultivares modernos de la fresa cultivada proceden de la identificación de genotipos superiores, la hibridación entre ellos y la selección de los mejores descendientes como cultivares potenciales o bien, como posibles parentales para las siguientes generaciones (Graham, 2005). Actualmente, es posible cultivar fresas en climas muy diferentes que van desde las zonas del Mediterráneo moderado a las zonas Subtropicales y de Taiga (Hancock y col., 1991). El desarrollo de estos cultivares dentro de los programas de mejora tradicional, se ha conseguido en su mayoría, abordando problemas similares relacionados con la resistencia a enfermedades y pesticidas, estrés ambiental, calidad de fruto y vida postcosecha (Faedi y col., 2000). Sin embargo, los mejoradores tradicionales encuentran serias dificultades en esta planta, debido fundamentalmente a su propia naturaleza octoploide, fuerte heterozigosis y origen interespecífico (Scott y Lawrence, 1975); además, la base genética del germoplasma es estrecha (Sjulin y Dale, 1987; Dale y Sjulin, 1990). La pérdida de vigor y producción así como del tamaño y otras características de los frutos, se acrecienta con las prácticas de mejora, ya que los principales cultivares de fresa proceden de antepasados comunes (Scott y Lawrence, 1975). Además, incluso en el caso de que un carácter sea controlado por un único gen, los modelos de segregación y recombinación son altamente irregulares e impredecibles en la progenie de semillas (Darrow, 1966; Scott y Lawrence, 1975); por tanto, el éxito en la mejora dependerá de la combinación de factores tanto genéticos como ambientales.

I.3.2 Mejora de la fresa mediante aproximaciones biotecnológicas

La mejora de la fresa mediante tecnologías basadas en el cultivo *in vitro* y la Biología Molecular, pueden solventar algunas de las limitaciones de la mejora tradicional, permitiendo desarrollar nuevos cultivares adaptados a las necesidades cambiantes de los consumidores y productores (Debnath y col., 2007).

Se han hecho grandes esfuerzos en investigación en *Arabidopsis* y otras plantas modelo, pero es necesario trasladar estos conocimientos a cultivos hortícolas de interés; de hecho, la fresa, dentro de la familia de las *Rosaceae*, es una planta idónea para los estudios de genómica funcional (Folta y Dhingra, 2006), que posteriormente podrán aplicarse a otras especies de la misma familia.

I.3.2.1 Regeneración *in vitro*: Organogénesis adventicia

La potencialidad que poseen las células diferenciadas para formar plantas completas se denomina totipotencia celular, y ésta se puede expresar vía organogénesis adventicia o embriogénesis somática. En la regeneración a partir de células diferenciadas, éstas suelen revertir al estado meristemático, proceso denominado desdiferenciación, para posteriormente sufrir una serie de divisiones sucesivas formando un tejido de callo desorganizado antes de dar lugar a la nueva estructura (morfogénesis indirecta), o bien, originarla directamente a partir de las células meristemáticas, conociéndose este proceso como re-diferenciación (morfogénesis directa).

En horticultura, el uso de hojas, tallos y raíces ha sido una práctica habitual para conseguir individuos nuevos regenerados en algunas especies. De hecho, la técnica de regeneración *in vitro* es una herramienta muy válida

para la propagación clonal, el mantenimiento de bancos de germoplasma y la ingeniería genética en cultivos hortícolas.

La obtención de brotes adventicios en fresa se ha logrado utilizando diferentes explantos (Folta y Dhingra, 2006; Debnath y col., 2007), siendo el disco de hoja el más empleado, tanto de plantas procedentes de invernadero como de cultivo *in vitro*. Así mismo, se ha obtenido regeneración de brotes a partir del cultivo de embriones somáticos (Wang y col., 1984), aunque el mantenimiento de estos cultivos embriogénicos no fue muy exitoso. Posteriormente, Biswass y col. (2009) obtuvo embriogénesis somática a partir de callo derivado de hoja.

En esta especie, son varios los reguladores hormonales empleados en la inducción de organogénesis adventicia, siendo sus combinaciones y concentraciones las principales diferencias entre los trabajos publicados en regeneración; así el tipo y concentración de auxina son muy variables, mientras que la citoquinina BA es la más utilizada (Folta y Dhingra, 2006), aunque en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso del tidiazurón (TDZ) en lugar de la benciladenina (Quesada y col., 2007). Además, otros factores pueden afectar a la regeneración de la fresa, como es la incubación previa en condiciones de oscuridad (Liu y Sandford, 1988; Debnath, 2005). En general, la capacidad de regeneración es aceptable, aunque claramente genotipo dependiente (Jones y col., 1988; Nehra y Stushnoff, 1989, 1990b; Passey y col., 2003).

La adaptación de las condiciones de cultivo, la combinación hormonal y el manejo, así como el tipo de explanto, han permitido obtener altas tasas de regeneración adventicia en diferentes variedades comerciales de fresa, de manera que este sistema ha sido el empleado con mayor éxito en la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Nehra y col., 1990a,b; Mathews y col., 1995; Monticelli y col., 2004), aunque también

podría utilizarse para generar variantes somaclonales (Biswass y col., 2009; Nehra y col., 1994).

I.3.2.2 Transformación genética

La tecnología de transformación genética es una de las herramientas más poderosas que existen dentro de la mejora vegetal. Tras introducir el gen de interés, habrá que seleccionar las células transformadas, cultivarlas, inducir su regeneración y aclimatar los brotes obtenidos, para posteriormente someter estas plantas y su progenie a una serie de tests tanto morfológicos como bioquímicos, para asegurar de este modo la estabilidad genética por un lado, y por otro, el mantenimiento de las características agronómicas del propio cultivar.

La modificación genética en fresa es especialmente interesante, ya que permite mejorar los cultivares existentes sin alterar otras características que le dan valor comercial (Passey y col., 2003). Además, al propagarse vegetativamente mediante estolones, se facilita la integración directa de los genes de interés en los cultivares seleccionados, sin que posteriormente haya que recurrir a la reproducción a través de semillas. Durante los últimos veinte años, se han puesto a punto en fresa protocolos de transformación adaptados a distintos cultivares; además, se han aislado y clonado varios genes, siendo especialmente interesantes los relacionados con la maduración (Graham, 2005). La fresa es un fruto no-climatérico, cuya maduración es un proceso complejo donde ocurren numerosos cambios a nivel de expresión génica.

La inserción del gen dentro de la célula vegetal puede ser directa o indirecta, mediante el uso de un vector. En fresa, el método más utilizado ha sido la transferencia a través de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 4), siendo las cepas más empleadas LBA4404, EHA105, AGL0 o C58 y sus derivados

(Folta y Dhingra, 2006). Los antibióticos usados para controlar el crecimiento de la bacteria después de la inoculación suelen ser carbenicilina, cefotaxima o timentina. También se han empleado otras metodologías en transformación en fresa sin tanto éxito, como son la electroporación de protoplastos (Nyman y Wallin, 1992b) o el bombardeo de partículas de ADN (Cordero de Mesa y col., 2000; Wang y col., 2004).

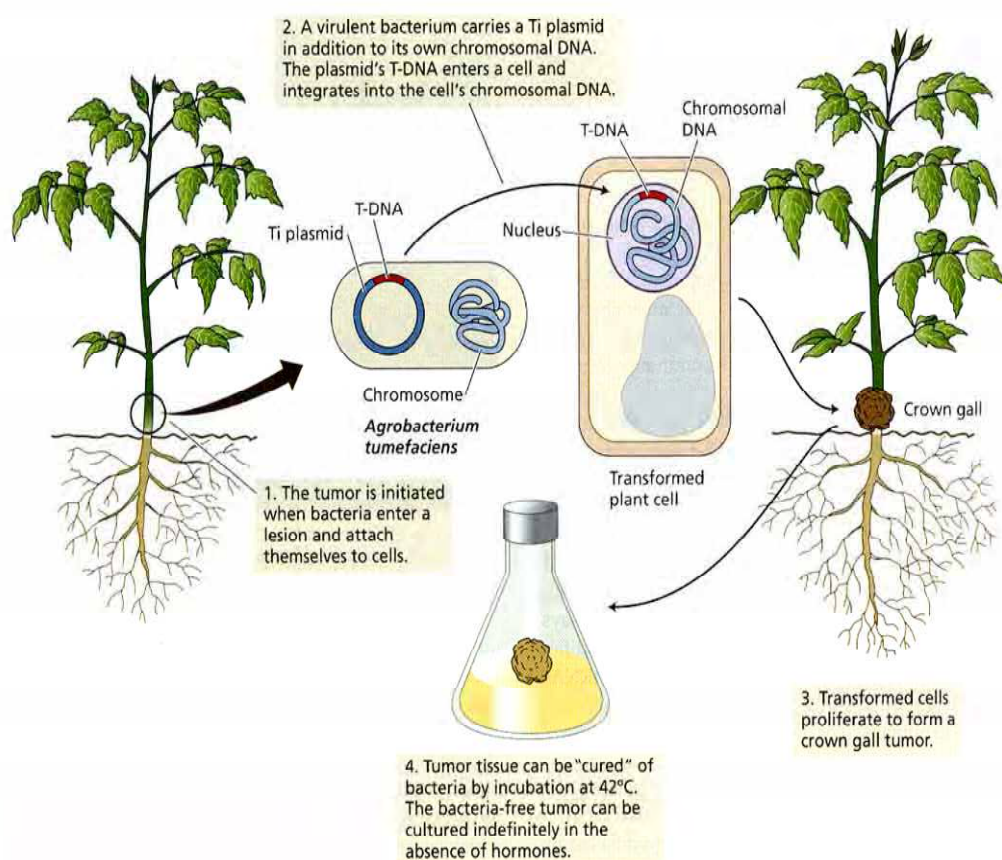


Figura 4. Inducción de tumores por *Agrobacterium tumefaciens* (Tomado de Chilton, 1983). En: L. Taiz y E. Zeiger. 2010. Plant Physiology (5th edición) . Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

Los primeros trabajos de transformación genética en fresa, aparecen en 1990 (James y col., 1990; Nehra y col., 1990a,b; El Mansouri y col., 1996; Barceló y col., 1998); a partir de aquí, se han ido desarrollando protocolos adaptados a distintos cultivares, introduciéndose con éxito algunos genes de interés, como aquellos que controlan resistencia a hongos o firmeza en frutos (Quesada y col., 2007). Nuestro grupo ha obtenido plantas de fresa con la expresión de ciertos genes de pared inhibida, mediante transformación en antisentido. Así, mediante el silenciamiento de genes que codifican las enzimas hidrolíticas pectato liasa y poligalacturonasa, se ha conseguido incrementar significativamente la firmeza del fruto (Jiménez-Bermúdez y col., 2002). Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Sesmero y col. (2007). Varios trabajos se han realizado transformando con β -(1,4)-glucanasa en antisentido (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; Palomer y col., 2006), no obteniéndose esta vez sin embargo, cambios en la firmeza de los frutos con respecto al control no transformado.

Existen una serie de riesgos asociados a las técnicas de transformación de la fresa, como son la disminución de la capacidad regenerativa de los explantos, la aparición de quimeras o la variación somaclonal. Es por ello que se necesita ser muy riguroso tanto en el desarrollo y aplicación de la metodología, como en la selección de los transformantes obtenidos, empleando agentes de selección adecuados en el medio, como kanamicina (25-75 mg.l⁻¹) o higromicina (4 mg.l⁻¹) (Debnath y Texeira da Silva, 2007), además de extremar los cuidados en el establecimiento y mantenimiento de las líneas obtenidas.

I.3.2.3 Aislamiento y cultivo de protoplastos

El interés por la manipulación de las células somáticas vegetales

empezó a partir del año 1960 cuando Cocking demostró la posibilidad de degradar enzimáticamente la pared celular. La obtención y cultivo de protoplastos tuvo un gran auge en la década de los 80 y principios de los 90; sin embargo, posteriormente decayó con el rápido avance de las técnicas de Ingeniería Genética. No obstante, en los últimos años, ha aumentado de nuevo el interés por los protoplastos en diferentes especies, enfocándose hacia la manipulación de los genomas citoplasmáticos, especialmente de las mitocondrias, y a la obtención de híbridos (Bhojwani y Dantu, 2013).

Aunque existen protocolos adecuados para aislar y cultivar protoplastos en diferentes plantas, son pocos los trabajos realizados con éxito en fresa (Davey y col., 2005); aún así, se han aislado protoplastos derivados de peciolas y de hojas (Johansson y col., 1988; Nyman y Wallin, 1988, 1992), así como de callo (Wallin, 1997). Medidas en el contenido de ADN de algunas de estas plantas mostraron diferencias en el nivel de ploidía (Graham, 2005). Infante y Rosati (1993) aislaron y regeneraron plantas a partir de protoplastos en *Fragaria vesca*; las plantas obtenidas no mostraron diferencias en su aspecto, cuando crecieron en el invernadero, al compararlas con los controles micropropagados. El aislamiento, cultivo y regeneración a partir de protoplastos es una técnica difícil, fuertemente influenciada por factores como la fuente de material, el medio de cultivo y las condiciones ambientales. Los protoplastos se pueden fusionar para obtener híbridos somáticos; así, Wallin (1997) obtuvo plantas regeneradas a partir de callo procedente de la fusión de protoplastos entre *Fragaria vesca* y *Fragaria x ananassa*, observando diferencias morfológicas posiblemente debido a la aparición de variación somaclonal. Son varios los autores que han mencionado la necesidad de mejorar la tecnología del aislamiento, cultivo y regeneración de brotes a partir de protoplastos de fresa (Debnath y col., 2007).

I.3.2.4 Variación somaclonal

En 1981, Larkin y Scowcroft definieron la variación somaclonal como la variación genética y epigenética obtenida en plantas regeneradas a partir de células somáticas. Aunque se ha utilizado para mejorar algunos caracteres agronómicos de interés, como es el caso de la resistencia a enfermedades fúngicas (Emaldi y col., 2004) o la adaptación a condiciones climatológicas adversas (Biswass y col., 2009), en general, esta variación puede reducir el valor comercial de los clones élite, constituyendo, por tanto, en muchas ocasiones, un problema dentro de los programas de mejora, así como en la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*, especialmente cuando el proceso de regeneración adventicia incluye una fase intermedia de callo (Viejo y col., 2012). Por otra parte, en plantas manipuladas genéticamente, la variación somaclonal representa una desventaja, ya que puede alterar otros caracteres no relacionados con el carácter que se pretende modificar (Quesada y col., 2007).

Los variantes somaclonales pueden ser permanentes o temporales; en el primer caso son heredables, y muchas veces responden a una variación preexistente en la fuente de material, o bien a una inducción de variación durante la fase de cultivo *in vitro* (Larkin y Scowcroft, 1981); en el caso de variaciones temporales, éstas obedecen a cambios epigenéticos o a efectos fisiológicos no heredables y reversibles (Kaepler y col., 2000).

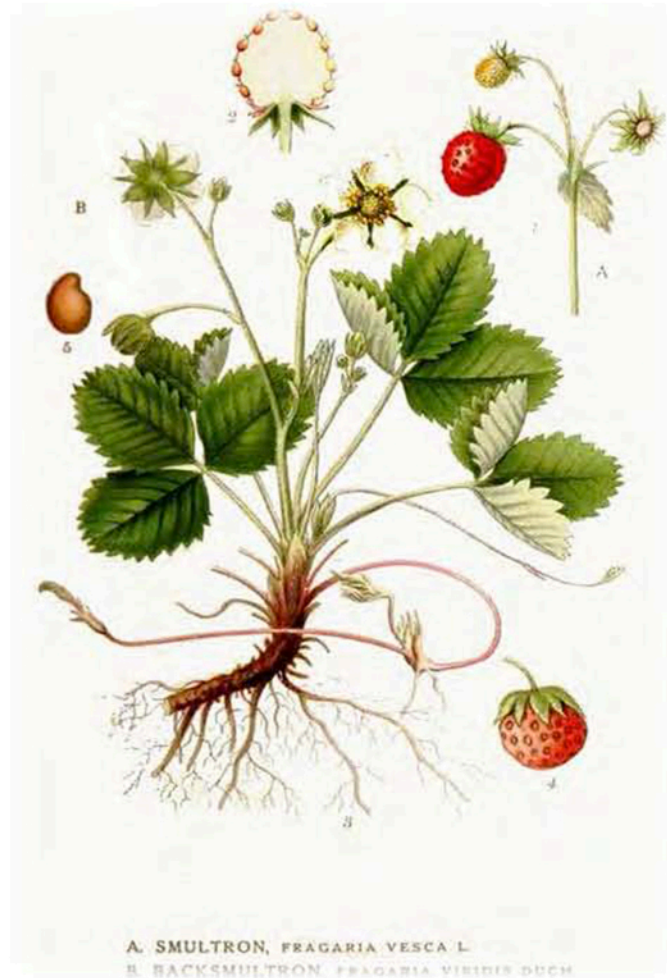
En las variaciones preexistentes es importante la elección del material de partida, ya que tanto su composición genética como su uniformidad son importantes para evitar problemas de aparición de quimeras. Además, se han observado con frecuencia variaciones en el número y estructura de los cromosomas, siendo especialmente importantes las roturas y reordenamientos en los variantes somaclonales. La regulación del ciclo celular es importante en la morfogénesis, de modo que cualquier alteración en éste puede ocasionar

variación somaclonal (Bairu y Aremu, 2011). Este tipo de variación puede afectar tanto a un solo carácter como al genoma completo de la planta, no limitándose únicamente al ADN nuclear (Gengenbach y Umpeck, 1982). Se cree que puede existir una relación entre la aparición de variación somaclonal y la activación de elementos transponibles o secuencias móviles de ADN en el genoma (Bairu y Aremu, 2011).

En relación con las variaciones inducidas, existen evidencias que relacionan una mayor posibilidad de aparición de variación somaclonal con ciertas prácticas de cultivo; así, además de la fuente de explantos, los métodos de propagación, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento, y el número y duración de los subcultivos pueden afectar al proceso (Pierik, 1987). Respecto al método de propagación empleado, una fase de crecimiento desorganizado favorece su aparición (Rani y Raina, 2000), por lo que, en principio, habrá más posibilidades de obtener variantes somaclonales al utilizar el cultivo de protoplastos y la regeneración adventicia con una fase intermedia de callo. Salvo excepciones, cuanto más diferenciados sean los tejidos (raíces, tallos, hojas..) más variantes se producirán (Sharma y col., 2007). Respecto a la influencia de los reguladores, no hay evidencias claras de su efecto como agentes mutagénicos, pero sí de su acción indirecta al estimular un crecimiento desorganizado (Karp, 1994); así, la inducción de callo en fresa usando altas concentraciones de 2,4-D se relaciona con la obtención de variantes somaclonales (Nehra y col., 1992). Sin embargo, no existe unanimidad respecto al papel del tipo y concentración del regulador hormonal sobre la aparición de variación somaclonal, en las distintas especies vegetales (Bairu y Aremu, 2011), aunque se ha observado que aumentos en el número de subcultivos y en su duración, generalmente favorecen la ocurrencia de este tipo de variación (Bairu y Aremu, 2006). Lo que no hay duda es que el

estrés sufrido durante el cultivo *in vitro*, puede inducir variación somaclonal, existiendo una respuesta diferencial en función del genotipo (Bairu y Aremu, 2011).

Los variantes somaclonales pueden detectarse mediante la aplicación de técnicas morfológicas y moleculares. La evaluación morfológica se basa en la identificación de individuos en función de los distintos caracteres de la planta, así como de su comportamiento en cuanto a producción y reproducción, aunque ésta se ve fuertemente influenciada por los factores ambientales, pudiendo no reflejar su verdadera composición genética (Mandal y col., 2001). Respecto a la evaluación molecular, las variaciones morfológicas visibles ocurren a mucha menor frecuencia que a nivel de ADN (Evans y col., 1984); en esta línea, existen diferentes técnicas para estudiar el genoma de las plantas, entre ellas, métodos citológicos para evaluar la variación en el nivel de ploidía o en el número y estructura de cromosomas, análisis de isoenzimas y proteínas y técnicas basadas en marcadores moleculares como son, el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (AFLP) y los microsatélites (Bairu y Aremu, 2011).



II. Objetivos

En este trabajo se pretenden establecer las bases para mejorar la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) mediante métodos biotecnológicos. Para abordar este objetivo global, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar los efectos de los procesos de regeneración y de transformación genética en la inducción de variabilidad fenotípica.
 - 1a. Desarrollar un método eficiente de regeneración, vía organogénesis adventicia, en los cultivares Chandler y Carisma, y evaluación morfológica, en condiciones de invernadero, de líneas del cultivar Carisma procedentes de distintos eventos de regeneración.
 - 2b. Desarrollar un método de transformación, vía *Agrobacterium tumefaciens*, en el cultivar Carisma y evaluación, en condiciones de confinamiento, de líneas procedentes de distintos sucesos de transformación.
2. Evaluar el papel del gen *Fxacad1*, implicado en la síntesis de lignina, en la modificación de la firmeza del fruto de fresa durante la maduración.
3. Establecer un método eficiente de obtención de protoplastos del cultivar Chandler y evaluación de las características agronómicas de los protoclones obtenidos



CAPÍTULO III

Regeneración vía organogénesis adventicia en los cultivares de fresa Chandler y Carisma. Puesta a punto de un sistema eficiente de transformación genética en Carisma vía *Agrobacterium tumefaciens* y evaluación del material obtenido

III.1. Introducción

La fresa cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.), un híbrido entre *F. virginiana* Duch. y *F. chiloensis* Duch, es una planta dicotiledónea octoploide ($2n=8x=56$), perteneciente a la familia de las Rosáceas, presente en la mayoría de las áreas cultivables del mundo. La fresa se consume fundamentalmente como fruta fresca, aunque su uso como procesado industrial está ampliamente difundido (conservas, mermeladas, jaleas, zumos...), lo cual la convierte en uno de los principales cultivos de baya (Childers, 1980). Es muy valorada por su contenido en carbohidratos poco calóricos (fructosa, glucosa y xilitol) y por tener un alto porcentaje de fibra; además, constituye una fuente natural de antioxidantes (Heinonen y col., 1988; Wang y col., 1996; Kähkönen y col., 1999), con actividad contra radicales libres (Wang y Jiao, 2000). Meyers y col. (2003) señalaban que, en fresa, los fenoles explican la mayor parte de su actividad antioxidante.

La fresa es un cultivo de gran importancia económica en España y particularmente, en Andalucía. Chandler es un cultivar de fresa con excelentes características agronómicas, y ha sido durante años la principal variedad cultivada en España. Se ha empleado como parental en programas de mejora, además de haber sido ampliamente utilizado en el procesado de fruta. Por otro lado, en el IFAPA Centro de Málaga se lleva a cabo un programa de mejora genética, y una de sus selecciones ha sido Carisma, un cultivar vigoroso y de día corto, cuyo buen comportamiento en vivero de altura facilita su multiplicación, presentando una alta capacidad para producir estolones. Es además muy productivo, con frutos grandes y de fácil recolección, teniendo una firmeza entre intermedia y alta, de color rojo, y buen sabor y dulzor. Como características propias de la planta cabría destacar su porte erecto y

vigor elevado (Marsal y col., 2000). La utilización de técnicas de ingeniería genética en ambos cultivares, Chandler y Carisma, requiere el desarrollo de protocolos de transformación y el establecimiento previo de sistemas eficientes de regeneración.

En fresa, son varios los factores que afectan a la capacidad de regeneración, entre ellos, el genotipo (Jones y col., 1988; Liu y Sandford, 1988; Nehra y Stushnoff, 1989, 1990a; Sorvari y col., 1993; Passey y col., 2003; Singh y Pandey, 2004; Hanhineva y col., 2005), la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación (Liu y Sandford, 1988; Nehra y Stushnoff, 1989), así como el tipo, fuente, y estado de desarrollo del explanto (Nehra y Stushnoff, 1989; Debnath y Texeira da Silva, 2007). De hecho, son numerosos los trabajos realizados sobre organogénesis adventicia de fresa a partir de diferentes explantos (hojas, peciolas, pedúnculos florales, tallos, estípulas, estolones, raíces, protoplastos de mesófilo, cultivo de anteras y embriones inmaduros), siendo el disco de hoja el más utilizado de todos ellos (Nyman y Wallin, 1988; Nehra y Stushnoff, 1989; Debnath, 2005); así, se han obtenido brotes a partir de este explanto en material procedente de campo (Nehra y Stushnoff, 1989), invernadero (Barceló y col., 1998; Debnath, 2005, 2006) o cultivado *in vitro* (Sorvari y col., 1993; Barceló y col., 1998; Passey y col., 2003; Yonghua y col., 2005). Por otra parte, se ha observado que la regeneración adventicia puede dar lugar a la aparición de variación somaclonal (Nehra y col., 1994; Biswas y col., 2009), y aunque esta técnica puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética (Karp, 1995), si lo que se quiere es mantener la uniformidad y las características de interés agronómico en el material regenerado, lo deseable es evitar o reducir, al menos, la aparición de plantas fuera de tipo.

En relación con el proceso de transformación genética de fresa, los primeros trabajos se publicaron en la década de los 90 (James y col., 1990; Nehra y col., 1990 a,b; El Mansouri y col., 1996; Barceló y col., 1998); no obstante, las frecuencias de transformación estaban muy influenciadas por el cultivar y el procedimiento empleado; así, se obtuvo una frecuencia de transformación de un 0,95% en el cultivar Rapella (James y col., 1990) y un 6,5% en Red Coat (Nehra y col., 1990b). En general, la eficiencia de transformación lograda, independientemente del método utilizado, es baja, además de ser genotipo dependiente (Quesada y col., 2007). Por otra parte, durante el proceso de transformación genética pueden aparecer fenómenos de variación somaclonal, ya sea como consecuencia de la regeneración adventicia en sí, o por alteraciones ocasionadas en el genoma de la planta como consecuencia de la inserción del T-ADN (Pineda y col., 2010; Atarés y col., 2011).

El primer objetivo de este trabajo ha sido estudiar la capacidad morfogénica mediante organogénesis adventicia del cultivar de fresa Chandler, nuestro cultivar modelo; a continuación, y utilizando el protocolo desarrollado, se estudió la regeneración en Carisma. Posteriormente, se evaluó la posible aparición de variación somaclonal en las plantas obtenidas de este cultivar. El protocolo de regeneración adventicia puesto a punto en este trabajo fue utilizado posteriormente para optimizar un sistema de transformación genética en Chandler (El Mansouri, 1997; Barceló y col., 1998). Tomando como base este protocolo, como segundo objetivo de este trabajo, se ha abordado la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* en Carisma, habiéndose llevado a cabo la caracterización morfológica y agronómica del material transgénico obtenido de este cultivar.

III.2. Materiales y métodos

III.2.1. Regeneración adventicia

III.2.1.1 Cultivar Chandler

Se partió de plantas libres de virus del cultivar Chandler crecidas en invernadero (Figura 1A). Como explantos se utilizaron discos de hoja de 4 x 4 mm, colocando la superficie adaxial en contacto con el medio (Figura 1B). El medio basal contenía los macronutrientes de la formulación mineral $N_{30}K$ (Margara, 1984) con los microelementos y las vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962).

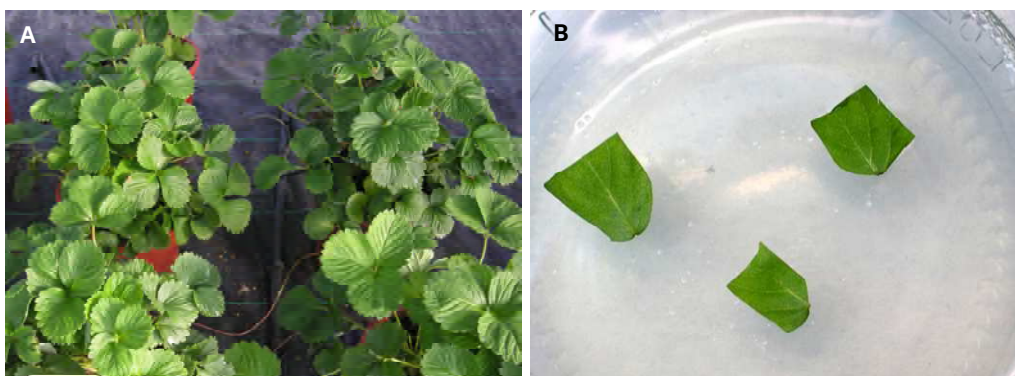


Figura 1.A: plantas de fresa, cultivar Chandler, mantenidas en invernadero en el centro IFAPA de Málaga, utilizadas como fuente de explantos. B: secciones de disco de hoja de fresa de 4x4 mm, cultivadas colocando la superficie adaxial en contacto con el medio.

El pH del medio se ajustaba a 5,7. Alícuotas de 25 ml de medio, se distribuían en tubos de ensayo de 25 x 150 mm cubiertos con tapones de

polipropileno. Todos los medios se autoclavaban 15 minutos a una temperatura de 121°C y 1,05 kg.cm⁻². Excepto para los tratamientos de oscuridad, las condiciones estándar de cultivo fueron temperatura de 25±1° C, y fotoperiodo de 16 horas bajo irradiancia de 40 μmol.m⁻².s⁻¹ procedente de lámparas Sylvania Grolux.

En el primer experimento de regeneración, se estudió el efecto del balance hormonal sobre la morfogénesis. Las combinaciones de reguladores de crecimiento usadas fueron BA (0, 0,5, 1, 2, 4, 8 mg.l⁻¹) y AIB (0, 0,5, 1 mg.l⁻¹).

Posteriormente, se evaluó la influencia de un pretratamiento de oscuridad (0, 1, 2 ó 4 semanas) sobre la capacidad de regeneración de los explantos. Tras la incubación en oscuridad, los explantos se transferían a condiciones de luz (fotoperiodo de 16 horas con irradiancia de 40 μmol.m⁻².s⁻¹). En este experimento, el medio basal fue suplementado con 1 mg.l⁻¹ BA y 0,5 mg.l⁻¹ AIB.

A continuación, se estudió el efecto sobre la regeneración de diferentes niveles de irradiancia (0, 20, 40 y 80 μmol.m⁻².s⁻¹). En este experimento, los explantos se preincubaron durante dos semanas en oscuridad, y el medio basal se suplementó con 1 mg.l⁻¹ BA y 0,5 mg.l⁻¹ AIB.

Finalmente, se comprobó el efecto que tenían las auxinas (AIB vs AIA, ambas a 0,5 mg.l⁻¹) en combinación con la citoquinina BA (2 mg.l⁻¹) sobre la organogénesis. En este experimento se utilizaron como explantos discos de hoja de plantas *in vitro* proliferando en medio N₃₀K suplementado con 0,33 mg.l⁻¹ BA (López Aranda y col., 1994) y los explantos se preincubaron durante dos semanas en oscuridad.

III.2.1.2 Cultivar Carisma

En los experimentos de regeneración del cultivar Carisma, como fuente de explantos se utilizó un stock de plantas de fresa iniciado a partir de ápices caulinares, siguiendo el protocolo de López Aranda y col. (1994) (Figura 2A). Una vez establecido *in vitro*, el material se subcultivaba periódicamente cada 4 semanas en medio $N_{30}K$ suplementado con $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ Kinetina (Barceló y col., 1998) (Figura 2B).

La regeneración se realizó siguiendo el protocolo estándar desarrollado para el cv. Chandler (Barceló y col., 1998). Así, se utilizaron discos de hoja de $4 \times 4 \text{ mm}$ del stock establecido *in vitro* (Figura 2C), que se mantuvieron durante 32 semanas en el medio de regeneración que contenía los macroelementos $N_{30}K$ de la formulación mineral de Margara (1984), microelementos y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), así como un suplemento de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ AIB y 2 mg.l^{-1} BA.



Figura 2. A: stock de plantas de fresa *in vitro*, cultivar Carisma, iniciado a partir de ápices caulinares según el protocolo de López Aranda y col. (1994). B: cultivo de plantas de Carisma *in vitro* en medio de multiplicación $N_{30}K$ $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetina (Barceló y col., 1998). C: aislamiento de explantos de disco de hoja a partir de folíolos.

III.2.1.3 Toma de datos

En los experimentos de regeneración en el cultivar Chandler, los datos se tomaron durante 6 subcultivos a intervalos de 8 semanas, evaluándose tanto el porcentaje de discos regenerantes, como el número de colonias de brotes producidas por disco regenerante. Al final de cada subcultivo, las colonias de tallos desarrolladas se separaban del explanto original, y el tejido remanente se transfería a medio nuevo para continuar la regeneración. Se utilizaron un mínimo de 20 explantos por tratamiento y los experimentos se repitieron dos veces. Se utilizó un diseño de bloques al azar en todos los experimentos. Se aplicó la transformación arcoseno (Sokal y Rohlf, 1981) a los porcentajes, antes de la separación de las medias por LSD a $P=0,05$. De igual modo, en el cultivar Carisma, los datos de regeneración se tomaron cada 8 semanas.

III.2.2 Aclimatación y evaluación agronómica de las plantas del cv. Carisma obtenidas vía organogénesis adventicia

Las plantas obtenidas vía organogénesis adventicia se pasaban a medio de multiplicación, $N_{30}K$ suplementado con $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetina, para la estabilización y proliferación del material. El enraizamiento se producía en este mismo medio. Una vez habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 3 cm de altura, las plantas se aclimataban siguiendo la metodología puesta a punto por López Aranda y col. (1994). Para ello, se colocaban en bandejas de alveolos con una mezcla de sustrato 1:perlita:arena de río (70:10:20), y se mantenían durante dos semanas en túnel de aclimatación. Transcurrido este periodo, se transferían a un túnel con apertura progresiva (Figura 3) durante una semana adicional, pasándose finalmente a túnel con apertura

permanente, donde permanecerían hasta alcanzar el tamaño adecuado para transplantarse a macetas de 9 cm de diámetro con una mezcla sustrato 1:arena de río (75:25), que se colocarían en un umbráculo durante la fase de endurecimiento.



Figura 3. Aclimatación de plantas de fresa, cv. Carisma, obtenidas mediante organogénesis adventicia *in vitro*, en túnel con apertura progresiva en invernadero.

Se establecieron de este modo 16 líneas regenerantes del cv. Carisma procedentes de distintos discos de hoja (sucesos independientes de regeneración), para proceder a su evaluación morfológica (generación F0). Tras el primer año de análisis en invernadero, las plantas fueron macropropagadas mediante estolonado para su análisis sucesivo durante un segundo y tercer año, (generaciones F1 y F2, respectivamente) (Figura 4). En todos los casos se trabajó con tres repeticiones por línea.

En las tres evaluaciones, se utilizaron como controles plantas obtenidas del stock de plantas micropropagadas procedentes del cultivo de ápices caulinares. Se tomaron datos de producción, peso medio del fruto y

área de la planta, durante las tres generaciones. El área de la planta se evaluó asociando la parte aérea a una elipse mediante la fórmula $A=(axb/4)\pi$, siendo a y b los ejes. Asimismo, se cuantificó el número de estolones. También se anotó la presencia de filodios en frutos maduros. En la F2 se evaluó, además, la longitud de peciolo y el número de folíolos por hoja.



Figura 4. Generación F1 de plantas de fresa, cv. Carisma, obtenidas mediante estolonado, mantenidas en invernadero para proceder a su evaluación morfológica.

III.2.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* del cv. Carisma

La transformación genética del cv. Carisma se abordó siguiendo el protocolo previamente desarrollado para el cv. Chandler (Barceló y col., 1998) con algunas modificaciones.

Se empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 conteniendo el plásmido no oncogénico pAL4404 y el vector binario pGUSINT (Vancanneyt y col., 1990). Este vector contiene el gen *nptII* de resistencia a

kanamicina y el gen marcador *uidA* bajo el control del promotor CaMV35S. El vector binario fue introducido en *Agrobacterium* mediante el método de congelación-descongelación (Holsters y col., 1978). La bacteria fue crecida a 28°C en medio LB conteniendo 50 mg.l⁻¹ de kanamicina.

Los explantos utilizados para la transformación fueron hojas completas procedente de plantas micropropagadas en medio N₃₀K suplementado con 0,47 mg.l⁻¹ kinetina. Experimentos preliminares en el cv. Chandler, mostraron que este tipo de explanto tenía mayor capacidad de regeneración que el disco de hoja. Los explantos fueron precultivados en el medio de regeneración, medio basal N₃₀K suplementado con 0,5 mg.l⁻¹ AIB y 2 mg.l⁻¹ BA, durante 10 días antes de la inoculación con *A. tumefaciens* (Figura 5).

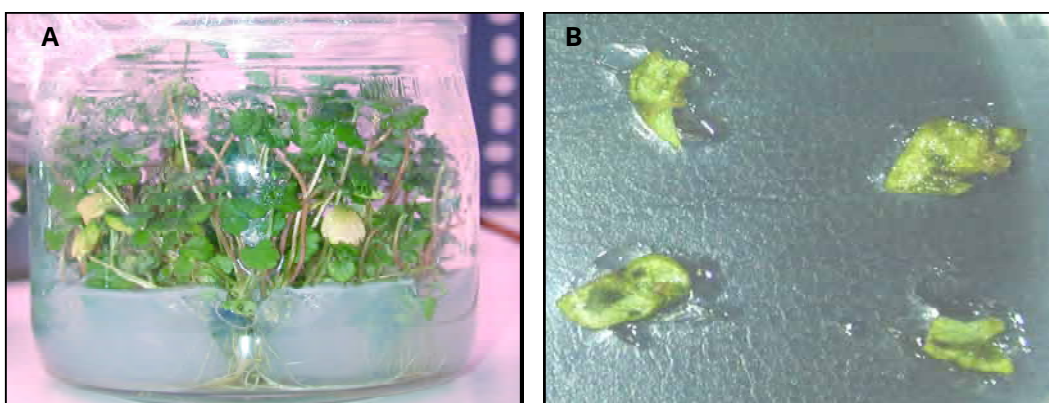


Figura 5. A: stock de plantas de fresa cultivar Carisma creciendo en medio de multiplicación. B: precultivo de los discos de hoja en el medio de regeneración conteniendo medio basal suplementado con 0,5 mg.l⁻¹ AIB y 2 mg.l⁻¹ BA antes de la infección con *Agrobacterium*.

Después del periodo de inducción, los explantos se colocaron en tubos de 50 ml y se inocularon durante veinte minutos en agitación suave con un

cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* crecido durante la noche y diluido a 1/10 en medio basal MS (Figura 6).

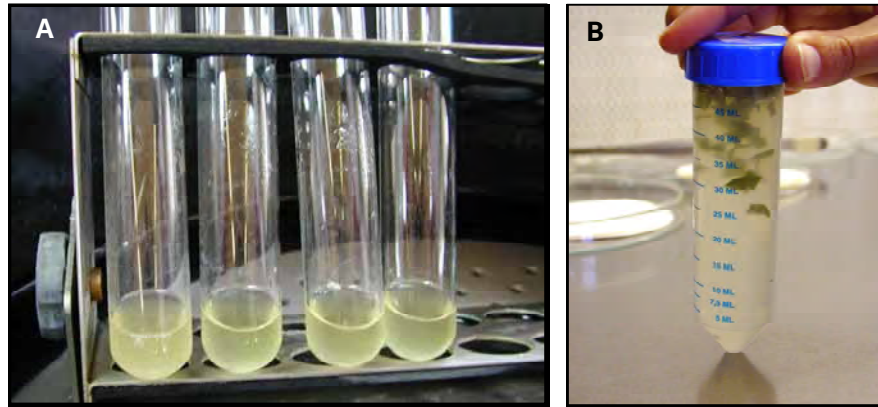


Figura 6. A: cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* en medio líquido. B: infección de los explantos con *Agrobacterium tumefaciens*.

Los explantos infectados fueron secados posteriormente en papel de filtro (Figura 7) y cultivados en el medio de regeneración durante 3 días. A continuación, los discos se transfirieron a medio de selección, el medio optimizado para la regeneración suplementado con 25 mg.l⁻¹ de kanamicina y un antibiótico bactericida, carbenicilina 500 mg.l⁻¹, cefotaxima 250 mg.l⁻¹ ó timentina 100 mg.l⁻¹. Los explantos se recultivaron a medio de selección fresco cada 3-4 semanas.

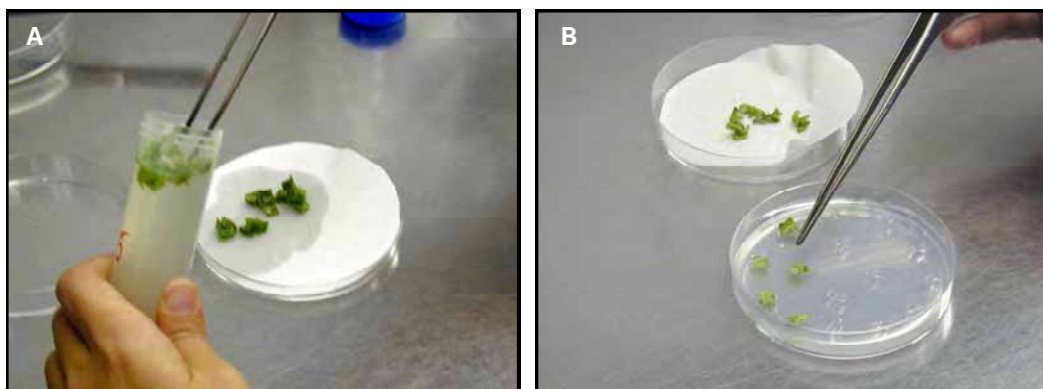


Figura 7. Secado de los explantos infectados en papel de filtro (A) y transferencia al mismo medio (B) antes de ser cultivados en medio de selección.

Una vez los brotes regenerados alcanzaban un tamaño de, al menos, 0,5 cm de longitud, éstos se separaban del explanto inicial, se identificaban individualmente como clones transgénicos independientes y se multiplicaban en medio $N_{30}K$ $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetina, al cual se le adicionaba kanamicina. El primer cultivo en el medio de microprogación se realizó en presencia de 25 mg.l^{-1} de kanamicina y en los siguientes se aumentó la concentración hasta 50 mg.l^{-1} , manteniéndose en esta concentración al menos durante tres subcultivos antes de su aclimatación a invernadero, para evitar en la medida de lo posible, la aparición de quimeras.

El porcentaje de transformación se calculó como el número de explantos con brotes verdes regenerados en presencia de kanamicina dividido por el número total de explantos inoculados.

La naturaleza transgénica de las líneas obtenidas se determinó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 220 pb del gen *nptII*. El ADN se extrajo a partir de hojas jóvenes, pequeñas y sin expandir, a las cuales se les eliminaba el nervio central, procedentes de plantas mantenidas

en invernadero. El material vegetal se congelaba en nitrógeno líquido. Para la extracción del ADN, 0,2 g de hojas finamente trituradas se lavaron cuatro veces en tampón de lavado (acetato potásico 100 mM pH 5.0, EDTA 20 mM, PVP 1% y β -mercaptoetanol 1%) (Mercado y col., 1999). Posteriormente, el ADN se extrajo con el kit comercial DNeasy Plant Mini kit (Qiagen). El ADN se cuantificó espectrofotométricamente mediante nanodrop. Los cebadores utilizados para la amplificación del ADN fueron: F: 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'; R: 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3'. La mezcla de reacción para la PCR contenía: cebador F 5 μ M, cebador R 5 μ M, dNTPs 5 μ M, tampón 10x 2 mM, agua milliQ, amplitaq (1:20). Las condiciones del termociclador fueron: 95°C (3'), 35x [94°C (30''), 60°C (30''), 72°C (45'')]; 72°C (3'); y 10°C ∞ . Se usaron dos controles negativos, correspondientes a los controles macro y micropropagado de Carisma, un control positivo correspondiente al plásmido pGUSINT y un control blanco que tenía sólo agua milliQ.

III.2.4 Aclimatación y evaluación morfológica de las líneas transgénicas del cv. Carisma

Los clones obtenidos, 27 líneas transgénicas independientes, se aclimataron siguiendo el protocolo puesto a punto por López-Aranda y col. (1994). Las plantas F0 se colocaron en macetas, con tres repeticiones por línea, y se mantuvieron en invernadero de confinamiento para ser evaluadas agrónomicamente siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado III.2.2 (Figura 8).



Figura 8. Plantas transgénicas de Carisma mantenidas en macetas y en invernadero de confinamiento para ser evaluadas morfológicamente.

Como controles, se utilizaron plantas procedentes de material macropropagado y micropropagado. Una de las líneas transgénicas (clon 36 G) murió durante la F0. Tras la caracterización de la F0, se evaluaron agronómicamente las generaciones F1 y F2, obtenidas mediante propagación vegetativa por estolonado.

III.3. Resultados

III.3.1. Regeneración adventicia

III.3.1.1 Cultivar Chandler

Inicialmente, se testó el efecto de la relación citoquinina/auxina en la capacidad de regeneración *in vitro* de los discos de hoja. Los resultados obtenidos a las 16 semanas de cultivo se muestran en la Figura 9.

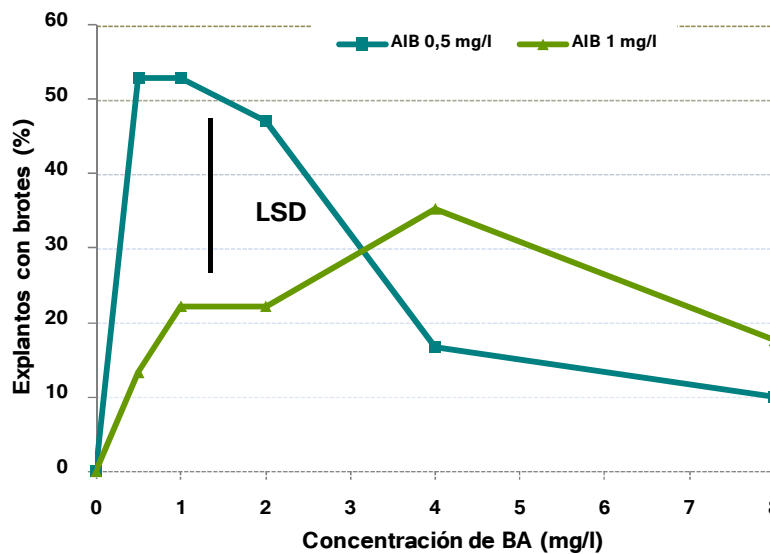


Figura 9. Efecto de la concentración de BA e AIB (mg.l^{-1}) sobre el porcentaje de regeneración de explantos de disco de hoja de fresa, cv. Chandler, a las 16 semanas de cultivo. La barra indica el valor de LSD a una $P=0,05$.

La presencia de auxina fue absolutamente necesaria para que la regeneración tuviera lugar, no observándose ésta cuando la auxina estaba ausente en el medio de regeneración. Los mejores resultados se obtuvieron con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ AIB; concentraciones mayores (1 mg.l^{-1}) tenían un efecto negativo sobre el proceso. Como se esperaba, la benciladenina también era necesaria, estando los niveles óptimos en un rango entre $0,5\text{-}2 \text{ mg.l}^{-1}$. Un porcentaje relativamente pequeño de discos de hoja ($5\text{-}15\%$) empezaron a regenerar después de 8 semanas, mientras que tras 16 semanas, un mayor número de explantos, alrededor del 50% , habían formado colonias. Inicialmente se eligió una concentración intermedia de BA (1 mg.l^{-1}) para usarla en experimentos posteriores; sin embargo, tras seis subcultivos adicionales en el medio de regeneración, el número medio de colonias de tallos por disco regenerante fue superior en el tratamiento que incluía BA a 2 mg.l^{-1} , $2,9$ colonias/explanto en BA 2 mg.l^{-1} frente a $1,3$ y $1,4$ en los medios

conteniendo BA 0,5 y 1 mg.l⁻¹, respectivamente. Por tanto, la concentración superior de BA se eligió como estándar y se usó para estudiar el efecto del tipo de auxina, así como en los experimentos de regeneración y transformación del cv. Carisma.

En un segundo experimento se testó el efecto de un pretratamiento de obscuridad sobre la capacidad de regeneración (Figura 10). Los explantos incubados en medio de regeneración fueron cultivados durante 0, 1, 2 ó 4 semanas en oscuridad y posteriormente transferidos a luz.

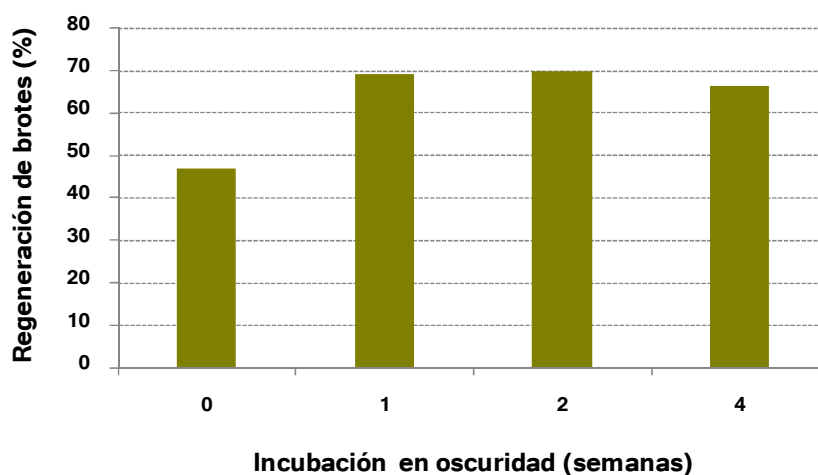


Figura 10. Efecto de la incubación en oscuridad de 1 a 4 semanas sobre el porcentaje de regeneración de brotes en discos de hoja de fresa, cv. Chandler, tras 16 semanas de cultivo.

Aunque no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de regeneración tras 16 semanas de cultivo, una incubación en oscuridad de una a cuatro semanas, aceleraba el proceso de regeneración observado tras ocho semanas, e incrementaba ligeramente los porcentajes de regeneración

tras 16 semanas desde un 47%, sin tratamiento de obscuridad, hasta un 68% después de 1-4 semanas de obscuridad.

No se detectaron diferencias claras en el número de colonias por disco regenerante, fluctuando en un rango entre 1,5 (1 semana de obscuridad) y 2,6 (0 y 4 semanas de obscuridad). Después de 16 semanas, sin embargo, brotes incubados durante dos semanas en obscuridad tenían mejor aspecto que los procedentes de otros tratamientos, eligiéndose dos semanas de obscuridad como tratamiento estándar.

A continuación, se estudió el efecto del nivel de irradiancia en la regeneración (Figura 11).

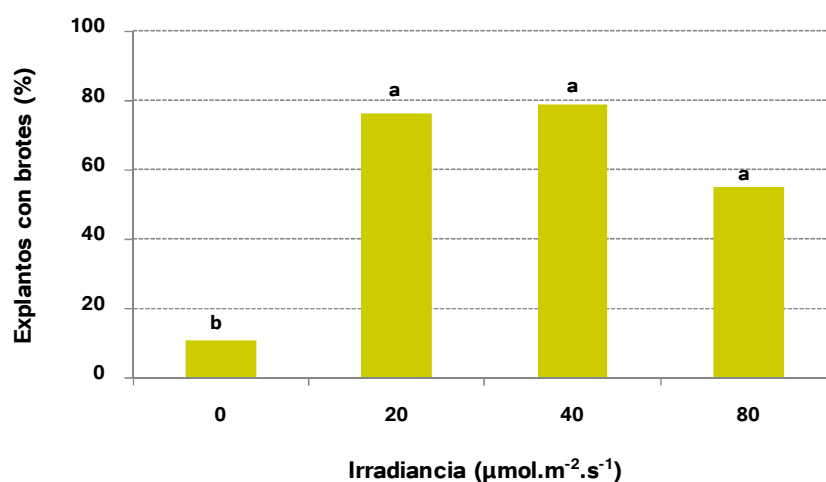


Figura 11. Efecto del nivel de irradiancia sobre la regeneración de discos de hoja de fresa, cv. Chandler. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con LSD a $P=0.05$.

La luz incrementaba significativamente la regeneración, especialmente en el rango de 20 a 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante el periodo de 0 a 16 semanas. El tratamiento de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ se eligió como estándar porque dió los

porcentajes de regeneración más altos, no detectándose diferencias en el número de colonias por disco regenerante, que variaba entre 1,9–2,2.

Finalmente, se estudió el efecto del tipo de auxina, AIB vs AIA, en la capacidad morfogénica. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, el porcentaje de regeneración más alto, 66,7%, se obtuvo con 0,5 mg.l⁻¹ AIB y 2 mg.l⁻¹ BA versus 58,3% en presencia de AIA-BA a concentraciones equivalentes. Por consiguiente, el primer tratamiento se eligió como estándar. El número de colonias por disco regenerante fue similar en ambos tratamientos.

III.3.1.2 Cultivar Carisma

Para la regeneración de Carisma se testó el protocolo desarrollado para el cultivar Chandler. Así, los discos de hoja fueron incubados en medio N₃₀K suplementado con AIB 0,5 mg.l⁻¹ y BA 2 mg.l⁻¹ durante 32 semanas, con subcultivos a medio fresco cada 4 semanas. Los explantos se incubaron inicialmente 2 semanas en oscuridad y posteriormente se transfirieron a luz, 40 µmol.m⁻².s⁻¹. El aspecto de los cultivos fue muy bueno durante las 4 y 8 primeras semanas; a partir de las 16 semanas, la apariencia de los discos era diferente, presentando un color marrón-negro en lugar de verde, y una textura más gelatinosa. Estas características se generalizarían en todos los explantos a las 24 y 32 semanas del inicio de los cultivos. En la Figura 12 se muestra el aspecto de los discos de hoja regenerando colonias de brotes de origen adventicio.



Figura 12. Diferentes imágenes de discos de hoja, regenerando brotes adventicios en el cultivar de fresa Carisma. A: brote emergiendo de la zona abaxial del disco de hoja. B: colonias adventicias. C: detalle de una colonia de plantas regeneradas.

El porcentaje de regeneración obtenido mediante organogénesis adventicia a las 16 semanas, fue de un 22%, aumentando hasta un 51% a las 32 semanas de cultivo, con un número medio de 2,13 colonias por disco regenerante (Tabla 1).

Tabla 1. Organogénesis adventicia en discos de hoja de fresa, cultivar Carisma, en medio $N_{30}K$ con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ AIB y 2 mg.l^{-1} BA.

Tiempo (semanas)	Regeneración de brotes (%)	Nº brotes/explanto
4	4,0	1,0
8	12,0	1,0
16	22,0	1,4
24	32,0	2,3
32	51,0	2,1

Los nuevos brotes adventicios de Carisma se enraizaron *in vitro* y se aclimataron siguiendo el protocolo utilizado para Chandler, obteniéndose un 100% de supervivencia.

III.3.2 Aclimatación y evaluación agronómica de las plantas del cv. Carisma obtenidas vía organogénesis adventicia

Con el fin de determinar la posible aparición de variación somaclonal en las plantas del cv. Carisma regeneradas *in vitro* siguiendo el protocolo previamente descrito, se analizaron agronómicamente 16 regenerantes independientes durante 3 años consecutivos. Durante el primer año se analizaron las plantas madre (F0) y durante los dos años siguientes, las plantas obtenidas mediante propagación vegetativa por estolonado (F1 y F2). La evaluación morfológica de las plantas mostró los siguientes resultados.

Área de la planta

Se observaron diferencias importantes en el área de la planta entre una generación y otra, tanto en el control micropropagado como en las líneas regenerantes (Tabla 2).

Tabla 2. Área de las plantas obtenidas vía organogénesis adventicia a partir de disco de hoja de fresa, cv. Carisma (F0). Posteriormente, las plantas obtenidas se multiplicaron durante dos generaciones sucesivas a partir de estolones (F1, F2). Área (%): valor medio del área de las plantas en las tres generaciones en porcentaje con respecto al control.

Área de planta (cm ²)					
Línea regenerante	F0	F1	F2	Media	Área (%)
C micro	401,3	624,7	561,4	529,1±115,1	100,0
3	371,5	437,1	424,1	410,9±34,7	79,4±11,8
11	353,0	391,1	216,3	320,1±92,0	63,0±24,7
12	367,0	381,5	–	374,2±10,3	76,3±21,5
13	441,8	382,8	374,4	399,6±36,7	79,4±26,8
14	490,9	542,5	660,5	564,6±87,0	108,9±19,3
15	382,9	354,5	601,4	446,2±135,1	86,4±26,4
19	444,5	452,0	711,3	536,0±151,9	103,3±27,9
20	494,8	453,6	639,1	529,1±97,4	103,2±26,9
24	359,3	470,5	579,9	469,9±110,3	89,4±14,0
26	339,7	331,4	592,7	421,3±148,5	81,1±26,4
27	133,5	152,2	–	142,8±13,2	28,8±6,3
29	318,9	400,4	737,9	485,7±222,1	91,7±35,3
33	379,7	407,8	519,5	435,7±74,0	84,1±16,4
36	198,3	357,4	133,5	229,7±115,2	43,5±17,5
39	359,8	703,3	534,1	532,4±171,8	99,1±12,0
48	438,3	812,0	747,2	665,8±199,7	124,1±13,0

Estas diferencias de crecimiento pueden deberse a variaciones en las condiciones ambientales del cultivo y/o la época del año en la que se muestreó cada generación. Para facilitar la comparación con el control micropropagado, en la Tabla 2, además de los datos medios, se incluye el

valor medio de área de planta en porcentaje con respecto al control, obtenido en las 3 generaciones evaluadas. En general, la mayoría de las líneas regenerantes, 11 de 16, dieron valores de área de planta ligeramente inferiores al control micropropagado en las 3 generaciones evaluadas, a excepción de las líneas 14, 19, 20, 39 y 48. Son destacables las líneas 27 y 36 que dieron plantas notablemente más pequeñas que el resto. Por el contrario, la línea 48 produjo plantas de mayor porte que el control.

Longitud de peciolo

La longitud del peciolo sólo se midió en plantas de la última generación (F2) (Figura 13).

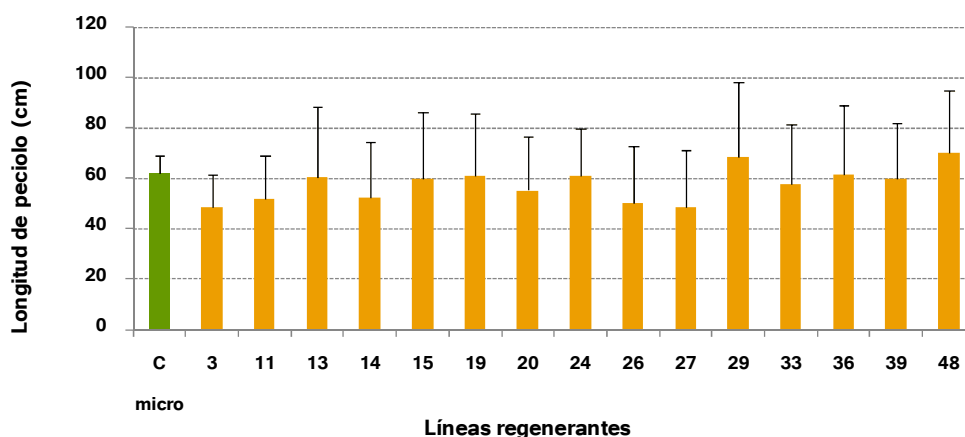


Figura 13. Longitud media de peciolo en plantas del cv. Carisma obtenidas vía regeneración adventicia a partir de disco de hoja de fresa, durante la segunda generación vegetativa F2.

No se observaron grandes diferencias entre el control micropropagado y las líneas regenerantes. Los clones 29 y 48 mostraron peciolo más largos

que el control micropropagado mientras que las líneas 3, 11, 14, 20, 26, 27 y 33 mostraron valores inferiores.

Número de foliolos

En la segunda generación vegetativa se contabilizó el número de foliolos por hoja, siendo en casi todos los casos de tres. Sin embargo, en todos los clones apareció alguna hoja con un único foliolo y únicamente en los clones 3 y 14 encontramos una hoja con dos foliolos; asimismo, en una planta del clon 29 había dos hojas con 4 foliolos. Por otro lado, en otros experimentos realizados por nuestro grupo (Apartado III.3.4), donde se evaluaron plantas de este cultivar propagadas por estolones, se observó claramente que las hojas presentaban mayoritariamente tres foliolos, aunque ocasionalmente apareció alguna hoja con dos foliolos.

Capacidad de estolonado

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en relación con el número medio de estolones por planta. Se obtuvo una baja producción de estolones, especialmente en las plantas madre (F0) y en la segunda generación vegetativa (F2); la media de las tres generaciones osciló entre 0,9 (clon 15) y 4,9 (clon 29) estolones por planta. Se observa cómo más de la mitad de los clones superaron al control micropropagado en capacidad de estolonado, exceptuando a la línea 15, aunque no se encontraron diferencias significativas en ningún caso.

Tabla 3. Número medio de estolones por planta de los somaclones obtenidos mediante organogénesis adventicia a partir de disco de hoja de fresa, cultivar Carisma (F0). Posteriormente las plantas obtenidas se multiplicaron por estolones durante dos generaciones sucesivas (F1, F2).

Línea regenerante	Nº estolones por planta		
	F0	F1	F2
C micro	0	3,9±1.9	0.8±0.8
3	0	5,3±3.5	2,0±0
11	1,5±0.7	6,3±2.1	1,7±1.5
12	1,0±1.4	1,3±2,3	
13	0	7,0±4.2	1,0±1.0
14	1,0±0	7.0±5.7	0
15	0,5±0.7	1,5±0.7	0,7±0.57
19	0,5±0.7	5,0±1.0	1,3±0.6
20	0	3,7±2.1	2,7±0.6
24	0	5,3±4.04	2,3±1.15
26	0	4,5±2.1	0,3±0.57
27	0	5,0±5,7	-
29	2,0±2.8	9,3±3.1	3,5±0.7
33	0	3,7±2.9	1,0±0
36	1,0±0	9,3±3.1	1,0
39	0	6,7±1.5	1,7±1.52
48	0,5±0.7	6,3±4.7	0,7±0.57

Producción

Los valores de producción en los 3 años evaluados, estimada como g fruto por planta, se muestran en la Tabla 4. El comportamiento en fructificación en las distintas generaciones varió entre los diferentes clones; así, muchos de ellos (líneas 3, 11, 13, 15, 19, 24, 26, 39, 48), incluido el

control micropropagado, aumentaron la producción desde la F0 a la F1, para luego disminuir en la segunda generación vegetativa; otros, sin embargo, (14, 20, 29, 33) disminuyeron su producción desde la primera a la última generación.

Tabla 4. Producción media en plantas obtenidas vía organogénesis adventicia a partir de disco de hoja de fresa, cv. Carisma (F0). Posteriormente las plantas se multiplicaron durante dos generaciones sucesivas a partir de estolones (F1, F2). Producción (%): Valor medio de la producción expresada como porcentaje del control micropropagado.

Línea regenerante	Producción (g/planta)				Producción(%)
	F0	F1	F2	Media	
C micro	121,9	308,1	84,0	171,3±119,9	100,0
3	84,3	150,9	47,6	94,2±52,3	58,2±10,2
11	44,7	91,1	59,4	65,1±23,7	45,7±22,0
12	24,6	65,1	–	–	--
13	135,0	239,0	155,9	176,6±55,0	124,6±55,3
14	144,4	101,7	97,9	114,7±25,8	89,3±48,8
15	179,8	205,3	107,1	164,0±51,0	113,8±42,1
19	90,2	259,1	115,4	154,9±91,1	98,5±34,0
20	262,7	226,5	127,0	205,4±70,3	146,7±71,1
24	238,9	283,7	173,6	232,1±55,4	164,9±63,3
26	66,9	80,9	2,5	50,1±41,8	28,0±26,0
27	0	0	23,0	–	--
29	29,9	17,5	17,3	21,6±7,2	16,9±9,9
33	138,7	131,3	186,1	152,0±29,7	126,0±90,0
36	27,2	23,3	37,5	29,3±7,3	24,8±18,6
39	131,1	377,4	67,4	191,9±163,7	103,4±18,6
48	136,1	319,1	179,5	211,6±95,6	143,0±61,3

En otros casos, se observó un comportamiento anómalo desde el principio; así, el clon 12 dio una producción baja en la F0 y la F1, desapareciendo finalmente en la F2. La línea 27 sólo produjo una pequeña cantidad de frutos en la última generación, para terminar también muriendo (Tabla 4).

Cuando se compara la producción con el control micropropagado, las líneas regenerantes 20, 24 y 48 destacaron por ser las que más producían (Tabla 4). Asimismo, los clones 13, 14, 15, 19, 33 y 39 presentaron una producción media similar a la del control (Tabla 4). Por el contrario, las líneas 3, 11, 26, 29 y 36 dieron una producción muy baja. En la Figura 14 se muestra la distribución de frecuencias de la producción media de las líneas regenerantes de Carisma obtenida en las 3 generaciones, con respecto a la del control micropropagado.

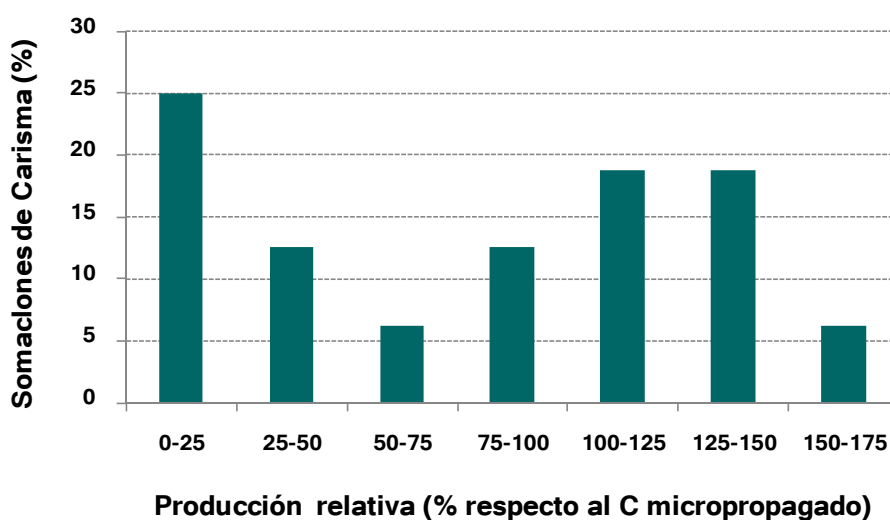


Figura 14. Distribución de frecuencias de la producción relativa en las líneas obtenidas mediante regeneración adventicia en Carisma. La producción se calculó como la media de las producciones obtenidas en las tres generaciones, con respecto al control micropropagado.

Nueve de las 16 líneas evaluadas, 56.2%, dieron una producción similar o superior al control. Por el contrario, el 25% de las líneas dieron una producción muy baja, inferior al 25% de la producción media obtenida en el control micropropagado.

A continuación, se muestra el tamaño de los frutos (Tabla 5).

Tabla 5. Peso medio del fruto (g) en somaclones de fresa, cultivar Carisma, obtenidos vía regeneración adventicia a partir de disco de hoja (F0). Posteriormente, las plantas se multiplicaron mediante estolones durante dos generaciones sucesivas (F1, F2). El (*) indica diferencias significativas por test T2 Tamhane a $P=0,05$.

Línea regenerante	Peso de fruto (g)			
	F0	F1	F2	Media
C micro	7,1	9,5	9,8	8,8±1.5
3	3,8	4,6	3,8	4,1±0.5*
11	4,0	3,9	3,4	3,7±0.3*
12	3,9	6,4	—	5,1±1.7
13	7,3	9,8	8,8	8,6±1.3
14	7,2	6,0	6,6	6,6±0.6
15	5,4	6,7	5,1	5,8±0.9
19	5,1	10,1	8,3	7,8±2.5
20	7,0	8,4	6,7	7,4±0.9
24	8,2	9,6	8,4	8,7±0.7
26	2,7	5,0	1,7	3,1±1.6*
27	0	0	3,6	--
29	2,7	7,3	2,8	4,3±2.6
33	6,8	8,5	10,9	8,7±2.0
36	9,9	4,1	3,3	5,8±3.6
39	8,4	7,7	5,4	7,2±1.6
48	6,7	8,6	9,4	8,7±1.4

En general, el peso medio del fruto en las líneas regeneradas fue bajo, y casi siempre inferior al del control micropropagado, siendo las diferencias con el control significativas para las líneas 3, 11 y 26.

En la F0, los valores de peso fluctuaron entre 2,7 y 9,9 g; en la generación hija (F1), aumentó ligeramente el peso, hasta situarse en el rango 3,9–10,2 g, fluctuando en la F2 entre 1,7 y 10,9 g. En el control micropropagado el peso de fruto se mantuvo en el rango 7,1 – 9,8 g. El peso medio de frutos procedentes de plantas de Carisma propagadas mediante estolonado, evaluado en otros experimentos por nuestro grupo de trabajo, bajo las mismas condiciones de cultivo, fue de 7,8 gramos.

Observando el peso medio de los frutos en las tres generaciones, en general, existe una relación directamente proporcional entre capacidad de fructificación y tamaño de fruto, ya que los clones menos productivos eran también los de menor peso medio de fruto (3, 11, 26, 27 y 29), a excepción del clon 14 que con una producción de 114,7 g por planta, dio frutos con un peso medio de 6,6 g. Asimismo, los clones que más producían (13, 15, 19, 20, 24, 33, 39, 48 y control micropropagado) dieron frutos más grandes.

En la Figura 15 se muestra la distribución de frecuencias de los pesos medios de fruto de las líneas regeneradas vía organogénesis adventicia en Carisma, en base al peso relativo de los frutos con respecto al del control micropropagado (100%). De manera similar a lo observado para la producción estimada como g de fruto por planta, el 50% de las líneas dieron frutos cuyo peso estaba comprendido entre el 75–100% del control, mientras que sólo 1 línea, 6.2% del total, dio frutos con un peso inferior al 25% del valor medio obtenido en el control.

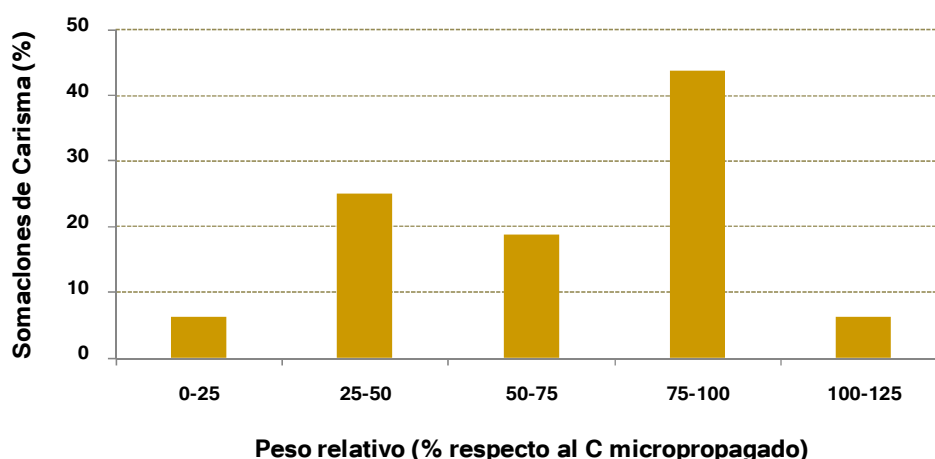


Figura 15. Distribución de frecuencias del peso relativo de fruto en las líneas de fresa, cultivar Carisma, obtenidas mediante regeneración adventicia. El peso relativo se calculó como la media de peso en las 3 generaciones con respecto al control micropropagado.

En general, las líneas regenerantes más productivas y con frutos de mayor tamaño se correspondían con las de mayor área, tal era el caso de los clones 14, 19, 20, 39 y 48, aunque los clones 13 y 15 con alta producción mostraron un área intermedia. El clon 29, sin embargo, siendo el que menos fructificó de todos, mostró un área media alta ($485,7 \text{ cm}^2$). Finalmente, los clones de menor área fueron el 12 y 27, los cuales acabaron desapareciendo, así como, el 11 y 36 que ya desde un principio se mostraron como clones poco productivos y con poco vigor. Globalmente, se observó una correlación positiva entre el área de la planta y la producción media (coeficiente de correlación de Pearson de 0,697, significativo a $P=0,01$), así como entre área y peso medio de fruto (coeficiente de Pearson de 0,664, significativo a $P=0,01$).

En relación con la morfología del fruto, la aparición de anomalías fue la tónica general en los somaclones de Carisma. La anomalía más frecuente fue

la aparición de filodios (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de frutos con presencia de filodios en somaclones obtenidos mediante regeneración adventicia a partir de disco de hoja de fresa, cultivar Carisma (F0); así como en las generaciones (F1, F2), obtenidas por estolonado.

Línea regenerante	Frutos con filodios (%)		
	F0	F1	F2
C micro	16,7	0,8	0
3	0	0	5,7
11	13,1	2,9	11,3
12	33,3	26,7	
13	10,8	0	1,9
14	14,0	4,8	0
15	0	0	0
19	8,1	0	0
20	0	0	0
24	3,5	0	0
26	65,0	14,6	25,0
27	–	–	0
29	0	0	0
33	0	0	0
36	0	14,3	0
39	0	0	2,9
48	14,6	0,9	0

Más de la mitad de los clones mostraron frutos rojos con filodios; sin embargo, no se observó un comportamiento uniforme en cuanto a su aparición, ya que en algunos somaclones estos desaparecían en el transcurso de las generaciones (14, 19, 24, 48 y control micropropagado), mientras que

en otros se mantenían (11, 12 y 26) o sólo aparecían en la F2 (3 y 39), en la F1 (clon 36) o bien, en la generación madre y en la última (13). También hubo clones que nunca presentaron filodios (15, 20, 29 y 33). El clon 12, que mostró un alto porcentaje de estas anomalías en la F0 y en la F1, acabaría muriendo en la F2, tal y como se ha señalado anteriormente.

También se observaron otras anomalías entre los frutos de algunos clones: semillas que germinaban precozmente, pulpas anormales y poco hidratadas, así como la aparición de frutos múltiples; sin embargo, estas deformidades, no parecían guardar relación alguna con la presencia de filodios (Figura 16). Destacaron los clones 12 y 26 porque ambos presentaban anomalías diversas en la F0 y F1, o el clon 3, con algunas deformaciones en la F1 que se incrementaron notablemente en la siguiente generación. Los clones 11 y 36 presentaron anomalías en la última generación. Todos estos somaclones con deformaciones diversas, tenían en común que eran poco productivos. El control micropropagado también produjo al principio algunos frutos deformes (frutos múltiples en un mismo receptáculo, a veces con brotaciones precoces de los achenios), pero sólo en la generación madre (F0). Estas anomalías nunca se observaron en plantas de Carisma propagadas convencionalmente por estolonado y cultivadas en las mismas condiciones (Apartado III.3.4).



Figura 16. Imágenes de diferentes anomalías en frutos de somaclones de Carisma: A.: filodios. B: germinaciones de achenios. C: deformidades del receptáculo. D: distinto grado de aparición de filodios en frutos inmaduros. E: fruto deformado, con presencia de filodios en el borde. F: fruto deforme con achenio brotado en su extremo.

III.3.3 Transformación del cv. Carisma mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación en Carisma se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado para el cultivar Chandler (Barceló y col., 1998), aunque en este caso se utilizó hoja completa en lugar de disco de hoja, ya que experimentos previos mostraron que este tipo de explanto tenía mayor capacidad de regeneración que el disco de hoja. Los explantos se transformaron con la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 conteniendo el vector binario pGUSINT. El agente y nivel de selección empleado, kanamicina 25 mg.l⁻¹, fue el mismo que el usado en Chandler, ya que previamente se comprobó que Carisma tenía una alta sensibilidad a este antibiótico. Se realizaron 3 experimentos de

transformación en los que se testó el efecto del antibiótico bactericida (carbenicilina, cefotaxima o timentina) en la eficiencia de transformación.

A las pocas semanas de la infección, antes de que los explantos empezaran a regenerar, se observó un cambio de aspecto de los mismos, volviéndose marrones, rizándose en ocasiones, y empezando a producir un callo oscuro, en la zona de corte que, ocasionalmente, viraba hacia verde. Los primordios se desarrollarían a partir del callo verde o verde-marrón, de textura compacta, producido inicialmente en la zona de la estípula y en los bordes de los folíolos, evolucionando posteriormente hacia brotes.

En función del antibiótico bactericida empleado, se encontraron diferencias en términos de capacidad de regeneración y precocidad en la respuesta de los explantos inoculados con *A. tumefaciens* (Figura 17).

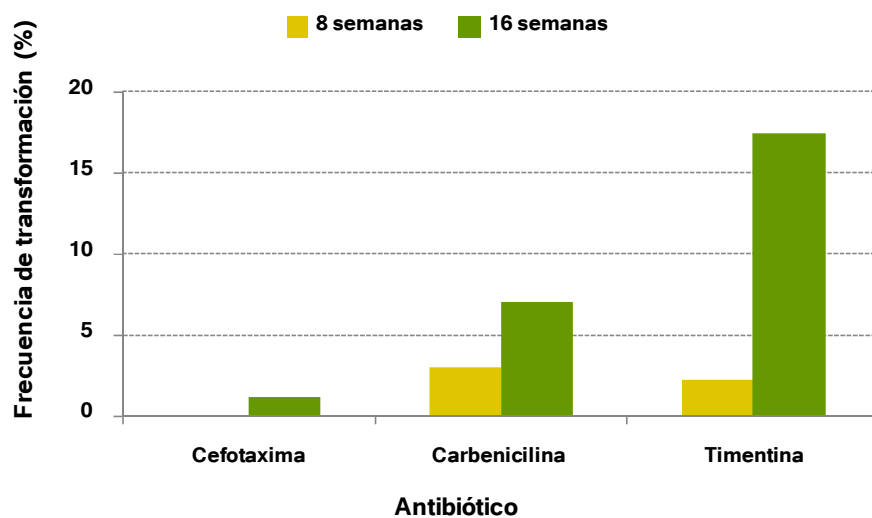


Figura 17. Frecuencia de transformación, calculada como porcentaje de explantos con brotes a las 8 y 16 semanas de la inoculación con *Agrobacterium tumefaciens*, en presencia de distintos antibióticos para detener el crecimiento bacteriano.

Aunque con carbenicilina se obtuvo una mejor respuesta al inicio de los cultivos, los resultados en capacidad de regeneración, fueron claramente superiores a partir de las 16 semanas en presencia del antibiótico timentina, alcanzándose una frecuencia de transformación superior al 17%. Por el contrario, en presencia de cefotaxima en el medio de selección, no se obtuvo regeneración hasta pasadas las 12 semanas. Este antibiótico resultó ser muy eficiente para detener el sobrecrecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, pero afectaba negativamente a la capacidad de regeneración.

Contrariamente a lo que se había observado previamente en el cv. Chandler (El Mansouri, 1997; Barceló y col., 1998), donde apenas si aparecían quimeras o escapes durante la transformación, éstas se observaron frecuentemente en el cv. Carisma desde las primeras semanas de selección en presencia de 25 mg.l^{-1} de kanamicina. Los escapes se identificaban como tallos regenerados de aspecto blanquecino mientras que las quimeras aparecían como tallos verdes con presencia de hojas blancas. A las 8 semanas de cultivo, el 7% de los brotes regenerados en el medio suplementado con carbenicilina eran falsos positivos. Por el contrario, este porcentaje fue solo del 1% en el medio suplementado con timentina. Todos los escapes y quimeras eran eliminados una vez detectados, manteniéndose en cultivo sólo los brotes con crecimiento vigoroso y totalmente verdes. Los brotes regenerantes debían alcanzar un tamaño entre 0,5–1 cm de longitud antes de ser separados del tejido madre y micropropagados en medio N_{30}K $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetina. Para asegurar la eliminación de falsos positivos, se siguió una estrategia de selección progresiva. Los brotes regenerados en 25 mg.l^{-1} kanamicina fueron aislados y micropropagados en presencia de 50 mg.l^{-1} de kanamicina, manteniéndose en esta concentración durante 3

subcultivos. Posteriormente, se disminuyó la dosis del antibiótico hasta 25 mg.l⁻¹ previamente a su aclimatación. Todos los tallos aislados y cultivados de esta manera sobrevivieron a estos niveles de agente de selección. Las plantas enraizaron en el mismo medio de micropropagación suplementado con el antibiótico kanamicina y el utilizado para contener el crecimiento de *Agrobacterium*. Se obtuvieron un total de 27 líneas transgénicas independientes, que fueron aclimatadas y transferidas al invernadero para su análisis posterior.

El análisis mediante PCR mostró la naturaleza transgénica de todas las líneas evaluadas, como se observa en la amplificación de una banda de 220pb correspondiente al gen *nptII* en ADN aislado de hojas de las líneas transgénicas (Figura 18).

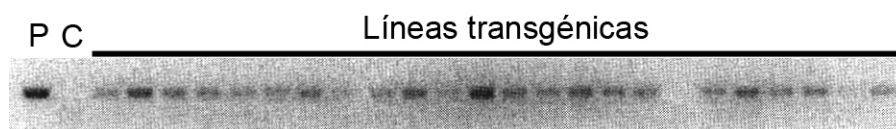


Figura 18. Amplificación por PCR de un fragmento de 220 pb del gen *nptII* en ADN genómico aislado de hojas de las líneas transgénicas de Carisma. P: plásmido pGUSINT; C: ADN de hojas control. Líneas transgénicas: cada pocillo corresponde con ADN de una línea transgénica independiente.

III.3.4 Aclimatación y evaluación morfológica de las líneas transgénicas de Carisma

Tras su aclimatación y endurecimiento en invernadero confinado, se procedió a realizar la evaluación morfológica de las 27 líneas transgénicas

independientes obtenidas (Figura 19). Se evaluaron tanto las plantas madre (F0) como las plantas hijas (F1 y F2) obtenidas mediante estolonado. Para estos experimentos, se utilizaron como controles plantas del cv. Carisma micropropagadas en medio $N_{30}K$ $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetina (control micro) así como plantas propagadas convencionalmente (control macro) que no habían pasado por cultivo *in vitro*.



Figura 19. Líneas transgénicas de Carisma mantenidas en macetas y en invernadero de confinamiento para ser evaluadas morfológicamente.

Área de la planta

En la Tabla 7, aparecen los datos relativos a la superficie de la parte aérea de las plantas en las 3 generaciones evaluadas. El control micropropagado presentó un porte superior al control macropropagado tanto en la F0 como la F1; sin embargo, en la F2 los controles macropropagados tuvieron una superficie ligeramente mayor.

Tabla 7. Área de la parte aérea de clones transgénicos de fresa, cv. Carisma, evaluados en invernadero de confinamiento. F0: plantas madre. F1 y F2: generaciones obtenidas mediante estolonado. Área (%): valor medio del área de las plantas en las tres generaciones en porcentaje con respecto al control micropropagado.

Línea transgénica	Área planta (cm ²)				Área (%)
	F0	F1	F2	Media	
C Micro	1431,8	605,3	347,2	794,7±566,6	100,0
C Macro	1105,1	360,2	454,0	639,8±405,7	89,1±37,1
1G	518,4	548,5	312,1	459,6±128,7	72,2±31,2
5G	602,9	466,5	405,7	491,7±101,0	78,7±38,0
9G	1063,8	467,6	678,3	736,6±302,4	115,6±69,1
11G	1466,9	582,7	702,7	917,4±479,6	133,7±59,8
16G	857,4	553,5	657,4	689,4±154,4	113,6±67,5
18G	755,6	385,6	397,2	512,8±210,3	77,0±32,9
19G	788,5	462,9	428,9	560,1±198,6	85,0±35,0
20G	1161,3	645,3	531,3	779,3±335,7	113,6±36,5
21G	1115,5	470,5	662,1	749,4±331,2	115,4±65,2
23G	1116,8	582,8	529,1	742,9±324,9	109,0±38,8
24G	999,0	548,5	392,3	646,6±315,0	91,1±21,6
25G	1172,2	745,3	571,2	829,6±309,2	123,2±41,3
26G	1295,9	843,5	773,1	970,8±283,7	150,8±66,8
27G	1039,6	495,6	563,4	699,5±296,5	105,6±49,3
28G	816,6	516,5	368,1	567,1±228,5	82,8±24,6
29G	1091,2	478,2	577,4	715,6±329,0	107,2±51,2
30G	1018,7	496,1	746,8	753,9±261,3	122,7±80,2
31G	1200,9	723,6	652,1	858,9±298,3	130,4±52,8
37G	869,7	486,4	289,9	548,7±294,9	74,9±12,3
39G	1181,8	443,4	505,0	710,0±409,7	100,4±39,3
40G	881,5	461,0	685,9	676,1±210,4	111,8±74,7
41G	1509,0	593,6	--	1051,3±647,3	101,7±5,2
42G	956,4	622,3	--	789,3±236,2	84,8±25,5
43G	610,0	676,5	314,2	533,5±192,9	81,6±35,4
44G	308,7	377,8	238,8	308,4±69,5	50,9±25,6
49G	1308,0	670,2	433,5	803,9±452,3	109,0±16,8

Respecto a la evolución de las distintas líneas a lo largo de las tres generaciones, el área de la planta fue significativamente mayor durante el primer año de ensayo (F0) en todas las líneas evaluadas, cuando se compara con los datos de los dos años posteriores. Probablemente, estas diferencias se deban a variaciones en las condiciones de cultivo en el invernadero que favorecieron un mayor crecimiento de las plantas durante el primer año.

Para facilitar la comparación entre los genotipos transgénicos y los controles, en la Tabla 7 se incluye el valor medio del área de planta relativizada con respecto al área de los controles micropropagados. No se encontraron diferencias significativas en la superficie aérea entre las distintas líneas y los controles micro y macropropagado, en ninguno de los 3 años evaluados.

Sólo las líneas 1G y, especialmente, 44G, mostraron un porte inferior a los testigos. Adicionalmente, una de las líneas transgénicas, clon 36G, destacó ya desde el principio por su bajo vigor, muriendo durante el primer año de evaluación morfológica.

El aspecto de las plantas era, en general, bueno, y el color resultó ser mayoritariamente verde (en un 66,7-100% de los casos), apareciendo clorosis sólo en casos aislados, lo cual es indicativo del buen estado general de las plantas.

Longitud de peciolo

En la Tabla 8, aparecen los valores de longitud media de peciolo.

Tabla 8. Longitud media de peciolo en clones transgénicos de fresa, cv. Carisma, evaluados en invernadero de confinamiento. F0: plantas madre. F1 y F2: generaciones obtenidas mediante estolonado. Longitud (%): valor medio de la longitud del peciolo en las tres generaciones en porcentaje con respecto al control micropropagado.

Línea transgénica	Longitud de peciolo (cm)					Longitud (%)
	F0	F1	F2	Media		
C Micro	16,0	10,0	6,2	10,7±4,9		100,0
C Macro	15,1	9,0	7,5	10,5±4,0		101,8±16,1
1G	10,2	8,9	5,9	8,3±2,2		82,9±16,7
5G	7,2	6,6	6,5	6,8±0,4		72,0±30,7
9G	11,9	8,4	8,7	9,7±2,0		99,7±35,0
11G	15,0	9,0	9,6	11,2±3,3		112,9±36,5
16G	12,5	8,7	8,3	9,8±2,3		99,8±29,7
18G	11,2	6,1	6,6	8,0±2,8		79,4±24,0
19G	10,6	7,5	6,3	8,1±2,2		80,8±17,9
20G	12,6	8,8	8,6	10,0±2,2		101,6±32,3
21G	12,3	8,1	9,2	9,8±2,1		102,0±36,6
23G	13,6	8,0	7,7	9,8±3,3		96,8±24,1
24G	11,4	8,5	7,0	8,9±2,2		89,5±21,5
25G	12,2	9,0	7,5	9,6±2,4		95,8±22,9
26G	12,3	8,5	7,1	9,3±2,6		92,4±20,2
27G	12,1	8,6	8,3	9,7±2,1		98,9±31,3
28G	10,3	8,4	6,2	8,3±2,0		82,7±17,8
29G	11,5	10,0	7,9	9,8±1,8		100,0±27,9
30G	11,8	8,7	8,7	9,7±1,8		100,2±34,8
31G	13,9	11,1	8,5	11,2±2,7		112,0±25,4
37G	13,6	9,5	5,2	9,4±4,2		88,1±6,5
39G	11,4	8,3	6,4	8,7±2,5		86,1±16,4
40G	12,0	7,9	5,7	8,5±3,2		82,3±9,1
41G	12,7	11,0	7,5	10,4±2,7		103,3±21,3
42G	12,3	8,3	6,3	9,0±3,1		87,4±13,1
43G	8,5	9,4	5,2	7,7±2,2		77,1±21,6
44G	7,3	7,1	5,1	6,5±1,2		66,3±18,7
49G	14,1	10,0	6,8	10,3±3,7		99,4±10,5

De manera similar a lo observado para el área de planta, la longitud de peciolo en todas las líneas evaluadas fue significativamente mayor en el primer año de muestreo (F0), disminuyendo en la F1 y F2.

No se encontraron diferencias significativas entre las líneas transgénicas y los controles, en ninguna de las 3 generaciones evaluadas. Sólo las líneas 5G y 44G presentaron peciolo más cortos, no alcanzando el 75% de la longitud media del control micropropagado (Tabla 8). En cuanto a las características de la hoja, el número de folíolos fue 3 en la mayoría de los casos.

Producción

Los datos de fructificación aparecen reflejados en la Tabla 9. El control micropropagado produjo más frutos que el macropropagado en las generaciones F0 y F1, invirtiéndose esta tendencia en la F2. La producción en las líneas transgénicas fue muy variable; así, observando los valores medios en las tres generaciones, vemos que mientras que algunos clones eran muy productivos (9G, 11G, 27G y 42G), superando incluso al control micropropagado, otros, sin embargo, presentaron una baja capacidad de fructificación (1G, 5G, 18G, 19G, 21G, 25G, 28G, 30G, 31G, 37G, 39G, 41G, 43G, 44G y 49G). Algunos clones destacaron por presentar un comportamiento anómalo; así, el clon 44 fue el que menos frutos produjo, dando solamente un fruto en la F2, mientras que el clon 41 no fructificó en la generación F1.

Tabla 9. Producción media acumulada en clones transgénicos de fresa, cv. Carisma, evaluados en invernadero de confinamiento. F0: plantas madre. F1 y F2: generaciones obtenidas mediante estolonado. Producción (%): Valor medio de la producción expresada como porcentaje del control micropropagado.

Línea transgénica	Producción (g/planta)				Producción (%)
	F0	F1	F2	Media	
C Micro	116,3	151,8	97,1	121,7±27,8	100,0
C Macro	79,6	109,9	120,1	103,2±21,1	88,2±30,8
1G	52,8	50,9	82,0	61,8±17,4	54,4±26,6
5G	66,2	35,5	115,1	72,3±40,2	66,3±48,3
9G	117,8	78,5	179,3	125,2±50,8	112,6±67,2
11G	213,5	85,9	119,1	139,5±66,2	121,0±63,5
16G	137,5	106,7	110,2	118,1±16,9	100,7±26,4
18G	20,0	53,8	51,9	41,9±19,0	35,4±18,1
19G	19,1	44,2	62,9	42,1±21,9	36,8±25,0
20G	108,5	107,1	133,3	116,3±14,8	100,4±34,0
21G	20,1	64,9	47,1	44,0±22,6	36,2±16,6
23G	104,6	94,3	154,0	117,6±31,9	103,6±49,7
24G	89,0	50,3	153,4	97,6±52,1	89,2±63,4
25G	70,8	88,3	110,1	89,7±19,7	77,5±31,2
26G	57,5	108,3	156,2	107,3±49,3	93,9±59,1
27G	147,0	126,1	126,3	133,1±12,0	113,2±26,2
28G	42,9	43,0	77,5	54,5±20,0	48,4±27,6
29G	125,4	65,5	154,9	115,3±45,6	103,5±58,4
30G	25,9	7,9	64,5	32,8±28,9	31,3±31,6
31G	112,4	47,7	88,0	82,7±32,7	72,9±36,0
37G	61,7	101,1	79,4	80,8±19,7	67,2±14,4
39G	89,3	93,7	76,4	86,5±9,0	72,4±9,3
40G	132,0	82,0	115,3	109,8±25,5	95,4±36,0
41G	45,9	0	41,7	29,2±25,4	27,5±23,9
42G	148,4	147,9	98,6	131,6±28,6	108,9±16,4
43G	30,8	81,6	53,5	55,3±25,4	45,1±16,1
44G	5,1	31,3	1,2	12,5±16,4	8,7±10,4
49G	21,6	50,8	56,1	42,8±18,6	36,6±19,8

La tendencia en la producción de frutos a lo largo de las distintas generaciones no fue la misma en todos los clones; así, mientras que en algunos casos (1G, 5G, 9G, 20G, 23G, 24G, 29G, 30G) se observó una disminución desde la generación madre a la primera generación vegetativa, incrementándose en la F2 hasta alcanzar los valores más elevados, en otros, la producción aumentó gradualmente desde la F0 a la F2 (19G, 25G, 26G, 28G, 49G y control macropropagado).

En otro grupo de clones, la mayor fructificación se obtuvo en la F0 (11G, 16G, 27G, 31G, 40G, 41G, 42G), y en todos ellos, ésta descendía desde la F0 a la F1, aumentando después en la última generación, pero sin llegar a superar a la producción obtenida en F0. Otras veces, se observó un aumento desde la generación madre a la F1, para luego disminuir (18G, 21G, 37G, 39G, 43G, 44G y control micropropagado).

En la Figura 20 se muestra la distribución de frecuencias de los valores de producción relativa de las líneas transgénicas obtenidas con respecto a la producción de los controles macro y micropropagado. El 42,3% de las líneas transgénicas, 11 de 26, dieron una producción similar a los controles micro y macropropagados. Por el contrario, sólo la línea 44G, 3,8% del total de líneas evaluadas, dio una producción inferior al 25% de la obtenida en los controles.

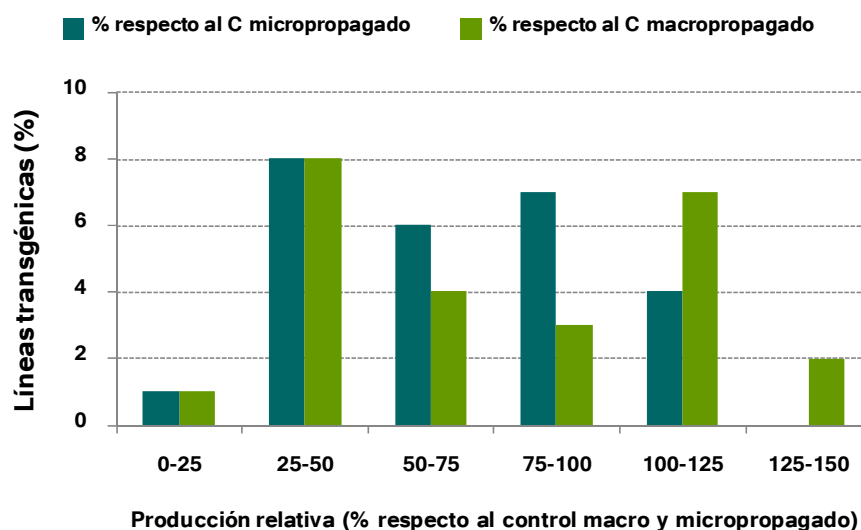


Figura 20. Producción relativa en clones transgénicos de fresa, cv. Carisma, con respecto a la producción de los controles macro y micropropagado.

En la Tabla 10 se muestran los datos de peso medio del fruto en las distintas líneas transgénicas. Los valores medios más altos los alcanzaron los clones 24G, 27G, 29G, 42G, control micropropagado y control macropropagado.

Los clones más productivos, 9G, 11G, 27G, 42G y control micropropagado, presentaron un peso medio de fruto alto, aproximadamente 7 g o superior; los clones con una producción intermedia entre ambos controles, 16G, 20G, 23G, 26G, 29G, a excepción de la línea 40G, daban frutos con un peso medio entorno a los 6 g; en general, los clones que menos fructificaban produjeron frutos con un peso medio menor, en torno a 3-4 g, a excepción del clon 24G que con una producción media-baja, dio frutos con un peso medio de 8,9 g, o los clones 1G, 37G, y 39G que dieron frutos entre 6,3 y 6,8 g.

Tabla 10. Peso medio de fruto (g) en clones transgénicos de fresa, cv. Carisma, evaluados en invernadero de confinamiento. F0: plantas madre. F1 y F2: generaciones obtenidas mediante estolonado. Peso (%): Valor medio del peso del fruto expresado como porcentaje del control micropropagado.

Línea regenerante	Peso de fruto (g)				Peso (%)
	F0	F1	F2	Media	
C Micro	7,4	7,7	10,8	8,6±1,9	100
C Macro	7,5	7	8,8	7,8±0,9	91,0±9,6
1G	4,6	8,5	7,5	6,8±2,0	80,2±25,9
5G	2,9	3,2	4,2	3,4±0,6	39,9±1,6
9G	6,7	6,5	7,5	6,9±0,5	81,3±10,8
11G	7,8	6,8	6,5	7,0±0,7	84,4±22,7
16G	6,9	7,3	8,3	7,5±0,7	88,0±9,6
18G	3	5,4	3,3	3,9±1,3	46,7±20,5
19G	3,6	4,1	5,6	4,4±1,0	51,3±2,7
20G	7,6	6,7	5,9	6,7±0,8	81,1±24,3
21G	5,0	5,6	5	5,2±0,3	62,2±13,6
23G	5,1	5,7	5,6	5,4±0,3	64,4±11,3
24G	9,2	7,2	10,4	8,9±1,6	104,5±17,1
25G	2,8	4,9	4,9	4,2±1,2	48,7±13,4
26G	6,4	6,9	7,1	6,8±0,4	80,5±12,8
27G	10,0	7,1	7,0	8,1±1,7	97,5±35,3
28G	5,0	5,2	7,1	5,7±1,2	66,3±0,8
29G	9,40	7,0	8,9	8,4±1,3	100,1±23,4
30G	5,6	4,0	5,0	4,8±0,8	57,4±15,4
31G	5,4	5,1	5,6	5,4±0,3	63,9±10,8
37G	7,1	8,2	4,5	6,6±1,9	81,3±34,7
39G	7,1	6,5	5,5	6,3±0,8	76,8±23,2
40G	6,7	6,5	8,2	5,0±1,0	83,5±7,1
41G	4,8	--	5,0	3,2±0,2	36,8±33,1
42G	9,3	9,6	7,9	8,9±0,9	107,7±29,9
43G	4,6	5,4	4,5	4,8±0,5	58,1±15,0
44G	3,0	5,2	1,2	3,1±2,0	39,9±28,3
49G	5,4	10,2	8,9	5,2±2,5	95,5±31,7

A pesar de estas variaciones, no se encontraron diferencias significativas en el peso entre los controles y las distintas líneas. Tampoco se observaron diferencias significativas cuando se analizó el peso relativo con respecto al control micropropagado.

En la Figura 21 se observa el peso relativo del fruto expresado como porcentaje con respecto al obtenido en los controles macro y micropropagados. La mayoría de las líneas dieron frutos con un peso situado en los bloques intermedios entre 50-75% y 75-100%.

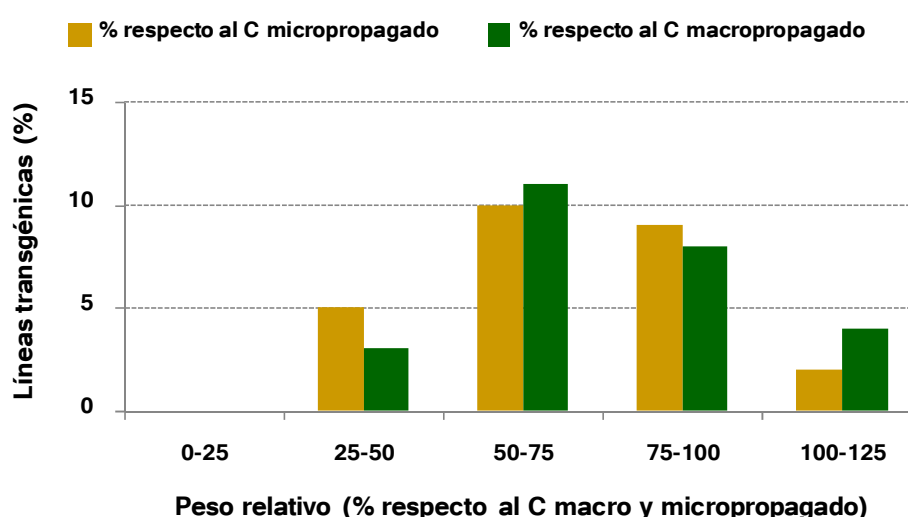


Figura 21. Peso relativo de fruto con respecto a los controles macro y micropropagados en clones transgénicos de fresa, cv. Carisma.

En cuanto a la morfología del fruto, prácticamente todos los clones, incluyendo los controles micro y macropropagados, presentaron filodios en los frutos recolectados, en alguna de las generaciones, exceptuando los clones 30G y 49G, si bien ambas líneas fueron muy poco productivas. En el primer año de evaluación (F0), los filodios se observaron en el 19% de las líneas

transgénicas pero no en los controles, apareciendo estas anormalidades principalmente en el mes de Mayo, algunos incluso en Junio, pero nunca en Julio. Durante la evaluación de la F1 y F2, los filodios se observaron en el 80 y 85% de las líneas transgénicas, respectivamente. En ambas evaluaciones aparecieron frutos con filodios en los dos controles. La recolección de frutos en la F1 y F2 se llevó a cabo desde Abril hasta Junio, apareciendo frutos con filodios en Abril y Mayo, pero muy escasamente en Junio. Las líneas transgénicas 1G, 5G, 16G, 31G y 43G destacaron por presentar frutos con filodios durante las 3 evaluaciones y, especialmente, la línea 43G por la abundancia de los mismos.

Por otro lado, en 12 de las 26 líneas analizadas se encontraron, en alguno de los años evaluados, otras anomalías como frutos deformes, pulpas anormales y poco hidratadas, aquenios atrofiados y mal distribuidos, a veces brotados. Estas anomalías también aparecieron en algunos frutos del control micropropagado durante las dos primeras generaciones, pero no se observaron en la F2 de ninguno de los controles. Cuando se analizan los datos por años, el porcentaje de líneas transgénicas que presentaron alguna de estas anormalidades fue del 28% durante la F0 y F2 y algo más baja, 11%, en la F1.

A continuación se muestran imágenes de frutos transgénicos de Carisma con filodios u otras anomalías (Figura 22).



Figura 22. Frutos transgénicos de fresa, cultivar Carisma, presentando diferentes anomalías. A: fruto con filodios, deformado en la base y en el extremo distal. B: fruto aberrante, con el receptáculo abierto y aquenios brotados. C-F: frutos multilobulados, con filodios.

III.4 Discusión

III.4.1 Regeneración adventicia

El balance hormonal es un factor clave en la regulación de la morfogénesis *in vitro* (Murashige, 1974). Nuestros resultados muestran claramente que en fresa, las auxinas juegan un papel clave en la diferenciación de brotes, dado que no se observó regeneración en ausencia de este regulador. Nehra y Stushnoff (1989) también señalan la importancia de la auxina en la regeneración de brotes de fresa, aunque ellos usaron AIA en lugar de AIB. Nuestros estudios comparativos entre ambas auxinas en el cultivar Chandler, no revelaron diferencias significativas, aunque se obtuvieron resultados ligeramente superiores en presencia de AIB, lo que confirma las observaciones previas de Liu y Sandford (1988). Para un nivel constante de auxinas de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, incrementos en la concentración de BA hasta 2 mg.l^{-1} mejoraron la formación de colonias de tallos. Además, el balance exógeno de citoquininas/auxinas permitió el mantenimiento de la capacidad de regeneración de brotes a través de los subcultivos. Las diferencias en la capacidad de regeneración bajo distintas combinaciones hormonales, podrían ser consecuencia de los niveles hormonales endógenos presentes en los distintos tejidos (Nehra y Stushnoff, 1989).

Por otro lado, se ha visto que una preincubación en condiciones de obscuridad mejora la morfogénesis en varios géneros, como *Cucumis* (Punja y col., 1990), *Nicotiana* (Chandler y col., 1987) y *Malus* (Fasolo y col., 1989). Este tratamiento parece disminuir la oxidación fenólica de los explantos (George, 1993). Nuestros resultados coinciden con los de Liu y Sandford (1988), quienes también recomendaron un pretratamiento de obscuridad para

incrementar la regeneración de brotes en *Fragaria x ananassa*. Asimismo, Debnath (2006) observó este mismo efecto al utilizar como explantos discos de hoja, pétalos y peciolo.

La morfogénesis se incrementa drásticamente por la luz, especialmente a irradiancia entre baja y moderada ($10\text{--}40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Murashige, 1974), mientras que niveles superiores de irradiancia podrían tener un efecto inhibitorio debido a la inactivación de la auxina (Fridborg y Eriksson, 1975) o al incremento en la producción de compuestos fenólicos (Andersen y Kasperbauer, 1973). En fresa, Nehra y Stushnoff (1989) recomendaban niveles bajos de irradiancia ($12,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para la regeneración de brotes en el cultivar Redcoat, observando que aumentos progresivos de la misma se traducían en una disminución del porcentaje de discos regenerantes, así como del número de brotes producidos por disco de hoja, llegando incluso a no regenerar bajo niveles de irradiancia de $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Estos autores explican estos resultados como consecuencia de la interacción entre los reguladores de crecimiento y el nivel de irradiancia en el proceso de regeneración, tal y como habían observado Parthier y col. (1987). Del mismo modo, Nehra y col. (1990c) sólo obtuvieron brotes a partir de callos procedentes de hojas *in vitro*, cuando el material se incubaba también a baja irradiancia ($12,5 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Sin embargo, en nuestro caso, y en ambos cultivares, se obtuvieron mejores resultados cuando se empleó una irradiancia moderada, en el rango de $20\text{--}40 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Respecto al origen del explanto, Liu y Sandford (1988), trabajando con el cultivar Allstar, encontraron diferencias en los requerimientos hormonales para tejidos de hoja derivados de plantas creciendo *in vivo* o *in vitro*. En nuestro caso, no se hizo una comparación directa entre las dos fuentes de

explanto; sin embargo, los resultados obtenidos en el medio de regeneración optimizado para discos de hoja de plantas creciendo en invernadero fue similar al obtenido cuando los discos de hoja se obtuvieron a partir de material micropropagado. Para evitar problemas de contaminación, en la transformación se utilizaron discos de hoja de brotes creciendo *in vitro*.

En cuanto al tipo de explanto, experimentos preliminares comparando disco de hoja y hoja completa en Chandler, mostraron una mejor respuesta de la hoja completa, por lo que este material fue el que se utilizó posteriormente en Carisma para los experimentos de transformación.

El sistema de regeneración adventicia desarrollado en este trabajo fue bastante eficiente, mostrando una baja dependencia del genotipo. No sólo se ha obtenido una alta tasa de regeneración tanto en el cv. Chandler como en Carisma, sino que además, este protocolo se ha utilizado con éxito para la regeneración *in vitro* de otros cultivares como Rosa Linda, Diamante, Gaviota y Sweet Charlie, con tasas de regeneración entre el 58-71% (Youssef y col., 2004).

III.4.2 Valoración agronómica de los regenerantes de Carisma

La mayoría de las líneas regenerantes de Carisma mostraron una superficie de la parte aérea inferior al control micropropagado. Además, 2 de las 16 líneas evaluadas, un 12,5%, tuvieron un fenotipo enano. Contrariamente a estos resultados, Biswas y col. (2009), al obtener plantas de fresa a partir de organogénesis directa e indirecta de hoja, embriogénesis somática indirecta también en explantos de hoja y cultivo de ápices caulinares, observaron, en la mayoría de los casos, un vigor superior en el material procedente de cultivo *in*

vitro frente a las plantas control, las cuales se habían obtenido mediante estolonado.

Aunque no hubo grandes diferencias en la longitud de los peciolo en Carisma, dos clones tuvieron peciolo de mayor longitud que el control micropropagado. Estos resultados coinciden con los de Youssef (2006), quien al estudiar las características fenotípicas de diez clones independientes regenerados a partir de disco de hoja en los cultivares de fresa Sweet Charlie, Rosa Linda y Gaviota, y siguiendo el mismo protocolo utilizado en este trabajo, no encontró diferencias significativas entre los clones regenerados y el control micropropagado. Nehra y col. (1994) observaron que en el cultivar Redcoat, las plantas propagadas *in vitro* tenían peciolo significativamente más largos que las propagadas por estolones, mientras que en Veestar no había diferencias. Nuestros resultados coinciden con las observaciones de estos autores para el cultivar Veestar, ya que se obtuvieron diferencias según la línea estudiada. Biswas y col. (2009) también obtenían diferencias fenotípicas en las plantas obtenidas *in vitro*; así, los peciolo de las hojas fueron más cortos y gruesos en plantas derivadas de brotes micropropagados, brotes procedentes de organogénesis directa e indirecta, así como de brotes derivados de embriones somáticos, frente a los de plantas control producidas mediante estolonado, siendo también normalmente el color de las hojas más claro en estas plantas.

Respecto a la capacidad de estolonado, no se observaron resultados especialmente relevantes. Carisma es una variedad caracterizada por producir un elevado número de estolones (Marsal y col., 2000); sin embargo, nuestros resultados no confirman esta observación, pues los valores obtenidos fueron bajos incluso en el control micropropagado. Aunque no se obtuvieron

diferencias significativas para este parámetro entre las distintas líneas evaluadas, la mayoría de los somaclones estolonaron más que el control micropropagado. Estos resultados no coinciden con los de Youssef (2006), quien observó que los clones de fresa obtenidos vía adventicia, producían ligeramente menos estolones que los controles micropropagados, obtenidos a partir del cultivo de ápices caulinares. De manera similar, Biswas y col. (2009), al evaluar la capacidad de estolonado en somaclones de fresa obtenidos mediante diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, durante el primer año de su implantación en campo, observaron una mayor producción de estolones en las plantas obtenidas a partir del cultivo de ápices caulinares, frente a las obtenidas vía organogénesis directa, indirecta, embriogénesis somática y plantas control obtenidas a partir de estolones; siendo esta capacidad prácticamente igual en plantas regeneradas mediante organogénesis, tanto directa como indirecta, y las plantas control. Esta respuesta diferencial del cultivo *in vitro* sobre la capacidad de estolonado puede tener una base genética. Así, Nehra y col. (1994), al comparar la capacidad de estolonado entre plantas propagadas *in vitro* por diferentes métodos y plantas propagadas convencionalmente, en dos cultivares de fresa, observaron diferencias claras en función del genotipo, pero no del método de propagación empleado. En el año de plantación, en Redcoat, las plantas procedentes de cultivo *in vitro* producían significativamente menos estolones que las propagadas de modo tradicional; sin embargo, en Veestar, y aunque no había diferencias significativas, en general, las plantas propagadas *in vitro* tenían mayor capacidad de estolonado que las macropropagadas, especialmente las obtenidas por regeneración adventicia a partir de disco de hoja. Al año siguiente, las plantas madres de ambos cultivares mantenidas en

invernadero durante un año adicional, mostraron mayor capacidad de estolonado que el control macropropagado mantenido en las mismas condiciones. Se cree que esto podría deberse a la influencia de las citoquininas empleadas en el medio de cultivo sobre el incremento de la actividad de yemas axilares (Waithaka y col., 1980). Sin embargo, las hijas de éstas (primera progenie obtenida mediante estolonado), se diferenciaban según el cultivar, de modo que mientras que en Redcoat no encontraron diferencias significativas entre los diferentes modos de propagación, en Veestar, esta capacidad era significativamente superior en las plantas procedentes del cultivo *in vitro*. Litwinczuk (2004), estudiando el comportamiento en campo de plantas de fresa del cultivar Senga Sengana obtenidas *in vitro* a partir de tallos adventicios y axilares y de su progenie estolonada, frente a plantas propagadas convencionalmente mediante estolonado, vieron como las plantas *in vitro* desarrollaban significativamente más estolones en el año de plantación, no ocurriendo lo mismo los dos años siguientes.

En la mayoría de los casos, los variantes somaclonales no se han incluido en los programas de mejora, bien porque los genotipos obtenidos eran inferiores agronómicamente, o porque algunos de los cambios producidos no eran heredables, o eran reversibles, como resultado de la expresión génica alterada (Karp, 1995). No obstante, Biswas y col. (2009) obtuvieron en fresa 3 selecciones estables a partir del cultivo de ápices caulinares, de brotes *in vitro* con 12 subcultivos, y de embriogénesis somática a partir de callo de hoja, que eran diferentes en producción así como en otras características morfológicas, y que presentaban potencial como nuevos cultivares comerciales de interés.

En nuestro caso, los resultados obtenidos en Carisma mostraron somaclones muy variables en capacidad de fructificación, obteniéndose algunos clones que fructificaban poco, o bien producían frutos de pequeño tamaño, y tan sólo una línea que claramente producía más que el control. Biswas y col. (2009) obtuvieron en plantas regeneradas vía organogénesis directa, durante el primer año de su plantación en campo, un número de frutos por planta inferior, aunque no significativamente, al de las plantas control, siendo el peso medio de los frutos significativamente superior al de los frutos control; además, encontraron diferencias claras en la morfología de los frutos procedentes de somaclones obtenidos con las diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, sobre todo a partir de embriones somáticos, que dieron frutos de mayor tamaño que el resto de los tratamientos. Adicionalmente, la mayoría de los somaclones produjeron frutos con diferencias en la textura con respecto a la de frutos control.

Nehra y col. (1994) observaron que los cultivares de fresa Veestar y Redcoat respondieron de manera diferente a las distintas formas de regeneración *in vitro*: cultivo de ápices caulinares, organogénesis adventicia indirecta (vía callo) u organogénesis directa a partir de disco de hoja. Así, al comparar las características reproductivas y vegetativas de estas plantas en condiciones de campo, frente a plantas propagadas de modo convencional a partir de estolones, vieron que en el cultivar Veestar no había diferencias ni en la capacidad de fructificación, ni en el tamaño de los frutos entre los diferentes métodos de regeneración; sin embargo, en Redcoat, las plantas procedentes del cultivo *in vitro* eran más precoces en floración y además, daban más frutos que las propagadas convencionalmente por estolones, siendo las que provenían de disco de hoja las más precoces, mientras que las

que provenían de cultivo de ápices caulinares dieron más flores y frutos. En Carisma, en la producción media relativa evaluada en la generación madre, 8 somaclones fructificaron más que el control micropropagado y 7 produjeron menos, mientras que en la generación hija (F1), sólo 2 líneas dieron más frutos que el control, siendo 13 esta vez las que fructificaron menos; finalmente, en la generación F2, la producción volvió a aumentar, al presentar 8 somaclones unos valores superiores al del control micropropagado. Globalmente, considerando las 3 generaciones evaluadas, la producción fue claramente superior al control en 1 línea (producción superior al 150% del obtenido en el control), igual o ligeramente superior al control en 8 líneas, e inferior al control en 5 líneas. Además, 2 líneas apenas produjeron frutos. Nehra y col. (1994) obtenían en la generación hija, una mayor fructificación en las plantas obtenidas *in vitro* y en ambos cultivares, frente a la producción de las propagadas convencionalmente. Nuevamente, este carácter de producción parece tener un componente varietal. Youssef (2006) también obtuvo resultados variables en producción, si bien, en general, la fructificación obtenida en los clones regenerados vía adventicia fue inferior a la de los controles micropropagados. Así, durante el primer año ni Sweet Charlie ni Rosa Linda dieron frutos; sin embargo, durante el siguiente año, el 50% de las líneas de ambos cultivares fructificaron, siendo Gaviota la que más frutos produjo, aunque no se diferenció significativamente de su control. Sólo un clon de Gaviota dio más frutos que el control, mientras que en Sweet Charlie y Rosa Linda, la mayoría de líneas fructificaron menos que el control.

En relación al tamaño del fruto, Nehra y col. (1994), en el cultivar Redcoat, observaron que no variaba significativamente entre los distintos métodos de regeneración; sin embargo, en Carisma, sí obtuvimos diferencias

significativas en el peso de los frutos de algunos clones con respecto al control micropropagado, aunque éste en general se mantuvo bajo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Youssef (2006) en regenerantes adventicios de Sweet Charlie, al producir frutos significativamente más pequeños que el control micropropagado, no ocurriendo lo mismo con los cultivares Rosa Linda y Gaviota. Por otro lado, la correlación entre producción y peso de fruto en las líneas regenerantes de Carisma fue alta (coeficiente de correlación de Pearson de 0,848, significativa a $P=0.01$), lo que sugiere que la disminución de la producción en estas líneas se debió principalmente a la reducción del peso del fruto.

La aparición de filodios en frutos maduros fue la tónica general en el cultivar Carisma, no encontrándose, por otro lado, una relación clara entre la aparición de los mismos y las características de los somaclones en cuanto a producción o vigor de la planta. Otras deformaciones difíciles de catalogar aparecieron en frutos de algunos somaclones, todos ellos muy poco productivos. Es importante destacar que también en el control micropropagado de Carisma se observó la aparición de filodios en las plantas madres durante las dos primeras generaciones; además, también aparecieron otras deformidades con mayor intensidad al principio, disminuyendo progresivamente hasta desaparecer finalmente en la generación F2, lo cual es indicativo de una fuerte influencia del cultivo *in vitro*, además del propio genotipo, pudiendo deberse la reversión al estado inicial en algunos clones, a una variación de naturaleza epigenética. Nuestros resultados contrastan con los de Nehra y col. (1994) quienes no encontraron anomalías fenotípicas durante el crecimiento en invernadero de las plantas propagadas *in vitro*, ya que sólo observaron amarillamiento de hojas en plantas procedentes del cultivo de

meristemos y de callo, y, ocasionalmente, irregularidades en floración y hábito de crecimiento en plantas derivadas de callo. Sansavini y col. (1989) señalan la aparición de rayas blancas, clorosis y enanismo en plantas micropropagadas de fresa obtenidas a partir de ápices caulinares; dependiendo del cultivar, la frecuencia de estas alteraciones oscilaba entre 0,048% y 0,461%. Estas anomalías morfológicas puntuales en material micropropagado también fueron observadas por otros autores (Swartz y col., 1981), incluyendo entre los cambios observados además del enanismo, alteraciones en el desarrollo de ramilletes florales, ausencia de estolones y esterilidad femenina. Otras veces, se han detectado variaciones que desaparecen con el tiempo; así Moore y col. (1991) observaron alteraciones en plantas del cv. Olympus que resultaron ser respuestas transitorias a las condiciones del cultivo. Por su parte, Nehra y col. (1994) observaron que en los genotipos Veestar y Redcoat, algunas plantas presentaban amarillamiento en hojas, fundamentalmente aquéllas que procedían del cultivo de callo y en menor grado, sólo en Redcoat, también en algunas de las obtenidas a partir de meristemos. Además, ocasionalmente vieron irregularidades en la floración y en el hábito de crecimiento en plantas procedentes del cultivo de callo. Sin embargo, todas las plantas obtenidas mediante regeneración adventicia a partir de disco de hoja, en ambos cultivares, mostraron un comportamiento uniforme en crecimiento, floración y fructificación (Nehra y col., 1994).

III.4.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* del cv. Carisma

Los primeros trabajos sobre transformación genética de fresa vía *Agrobacterium tumefaciens*, se llevaron a cabo en la década de los 90

(James y col., 1990; Nehra y col., 1990a,b; Jelenkovic y col., 1991; Mathews y col., 1995). Utilizando el protocolo de regeneración puesto a punto en este trabajo, Barceló y col. (1998) obtuvieron plantas transgénicas de fresa del cv. Chandler. En esa investigación, el uso de material micropropagado en presencia de kinetina como fuente de explantos fue clave para el éxito del proceso, obteniéndose una frecuencia de transformación del 4,2%. En el presente trabajo, usando explantos de hoja completa derivados de brotes del cv. Carisma proliferando en medio suplementado con kinetina y extendiendo el periodo de precultivo a 10 días, se obtuvieron tasas de transformación superiores. Un pretratamiento de los explantos con kinetina también mejoraba la frecuencia de transformación en tomate (Chy y Philips, 1987). En los cultivares de fresa Jonsok e Hiku, Sorvari y col. (1993) mostraron cómo un pretratamiento de la fuente de explantos con otra citoquinina, BA a 3 mg.l^{-1} , incrementó la respuesta organogénica. En otras especies, como *Pinus pinaster* (David y col., 1982) y *Morus alba* (Oka y Ohyna, 1981) se obtuvieron resultados similares. En nuestro caso, brotes de fresa proliferando durante 3-4 subcultivos en presencia de BA estaban miniaturizados y desarrollaban ligeros síntomas de hiperhidricidad, mientras que aquéllos que proliferaron en presencia de kinetina tenían mejor aspecto. Probablemente, en el último caso, la población de células competentes se incrementa y, como indicaba Potrykus (1991), esto puede resultar en una mejora de la tasa de transformación. McHughen (1993) señaló también la importancia de utilizar un periodo adecuado de precultivo para obtener una transformación eficiente. Incrementos en la duración del periodo de precultivo incrementaban la proporción de células competentes y, por tanto, la probabilidad de que *Agrobacterium* transfiriera su T-ADN (Nehra y col., 1990b). Obviamente, hay una mayor

probabilidad de que ocurran escapes, pero eliminar los antibióticos durante los primeros estados de la organogénesis parece ser importante, ya que éstos interfieren incluso con el desarrollo de las células transformadas (Michelmores y col., 1987; James y col., 1989).

El cultivo de explantos en el medio de selección justo después del cocultivo es necesario para impedir la proliferación de sectores no transgénicos. La alta sensibilidad de los tejidos de fresa a kanamicina ha sido observada por varios autores (Nehra y col., 1990b; Barceló y col., 1998; Mathews y col., 1998; Schestibratov y Dolgov, 2005; Husaini y col., 2011). Así, Nehra y col. (1990b), al transformar explantos de disco de hoja del cultivar Redcoat, comprobaron que la kanamicina inhibía la capacidad de regeneración a concentraciones incluso de 25 mg.l^{-1} . De hecho, raramente observaron organogénesis al colocar los explantos inoculados con *Agrobacterium* inmediatamente después del cocultivo en presencia de kanamicina, por lo que utilizaban un precultivo durante 10 días en medio de regeneración con cefotaxima y carbenicilina únicamente, antes de transferir los explantos al mismo medio, pero suplementado también con kanamicina (50 mg.l^{-1}). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los suyos, ya que sí se observó regeneración al colocar los explantos directamente tras el cocultivo en el medio de selección con 25 mg.l^{-1} kanamicina.

El riesgo de obtener quimeras, al usar como explanto estípulas, ha sido señalado en varias ocasiones (Monticelli y col., 2002; Chavali y col., 2003). En nuestros experimentos de transformación en Carisma, dado que la hoja completa contenía estípulas, tratamos de eliminar los posibles meristemos presentes en las mismas mediante cortes en su base con bisturí; aún así, la aparición de quimeras en los brotes transformados fue frecuente, a pesar de

la alta sensibilidad de este material a la kanamicina. Para solucionar este problema, se siguió un procedimiento de selección progresiva, donde los brotes regenerados fueron aislados y micropropagados en presencia de 50 mg.l⁻¹ de kanamicina durante al menos 3 subcultivos. Siguiendo este procedimiento, todas las líneas que finalmente sobrevivieron a esta selección progresiva eran transgénicas, como lo demuestra la amplificación de un fragmento del gen *nptII* en ADN genómico. Adicionalmente, se llevaron a cabo ensayos histoquímicos de actividad GUS en algunas de las líneas, observándose coloración azul en el tejido.

Por otro lado, Nehra y col. (1990a) encontraban ciertas dificultades para enraizar los brotes transgénicos obtenidos en presencia de kanamicina (25 mg.l⁻¹). Mathews y col. (1995) sugerían que la falta de esta capacidad podía deberse a la presencia de una alta proporción de células no transformadas en los brotes obtenidos, utilizando el enraizamiento en presencia de kanamicina como marcador de selección de brotes transgénicos. En nuestro caso, tras seguir el procedimiento de selección progresiva, los brotes transgénicos obtenidos enraizaban sin dificultad en presencia de este antibiótico, lo que descarta la presencia de material quimérico.

Los resultados obtenidos en Carisma muestran que el antibiótico empleado para contener el sobrecrecimiento de *Agrobacterium* también era importante en la transformación, obteniéndose los mejores resultados al utilizar timentina, lo cual confirmaba las observaciones previas de Husaini (2010). Carbenicilina, cefotaxima y timentina, en el rango 250–500 mg.l⁻¹, son los antibióticos más frecuentemente utilizados para eliminar o inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* tras la infección de los explantos. Sin embargo, existen numerosos trabajos que muestran un efecto, positivo o negativo, de

estos antibióticos en el proceso de regeneración (Padilla y Burgos, 2010). Se ha sugerido que estos antibióticos o parte de los mismos tienen actividad hormonal (Holford y Newbury, 1992; ur Rahman y col., 2004; Shehata y col., 2010). En el caso concreto de la fresa, concentraciones de cefotaxima de 500 mg.l⁻¹ inhiben la regeneración (Husaini, 2010), lo que podría explicar la baja tasa de transformación obtenida en Carisma al utilizar este antibiótico. De manera similar a lo observado en este trabajo, la timentina es más efectiva en la recuperación de plantas transgénicas en otras especies (Tang y col., 2000; Palomo-Ríos y col., 2012).

El protocolo de transformación desarrollado en Chandler (Barceló y col., 1989) y aplicado a Carisma, permitía obtener una frecuencia de transformación del 17%; por ello, aunque la falta de vigor y la disminución de la capacidad de regeneración son unos de los principales problemas en la obtención de cultivos transgénicos (Kaeppeler y col., 2000), el protocolo desarrollado puede ser útil para ser usado en cualquier aproximación biotecnológica enfocada a la mejora de este cultivar.

III.4.4 Evaluación morfológica de las líneas transgénicas de Carisma

De manera similar a lo observado en el estudio previo del comportamiento agronómico de las líneas regenerantes de Carisma, se observó una gran variabilidad en el área de la planta entre las distintas líneas transgénicas, así como entre las generaciones evaluadas. Sin embargo, tan sólo una línea mostró escaso crecimiento, con valores de área media en torno al 50% del obtenido en el control. En el estudio de las líneas regenerantes, 2 líneas de las 16 evaluadas mostraron un fenotipo enano. Considerando los valores medios de todas las líneas transgénicas analizadas, el área de planta

fue un 87% del obtenido en las plantas micropropagadas. Un valor similar, 82%, se observó al comparar la media de todas las líneas de regeneración adventicia con respecto a su control micropropagado. En un estudio similar con plantas transgénicas del cv. Chandler, llevado a cabo por Jiménez-Bermúdez (2005), no se observaron plantas enanas entre las diferentes líneas independientes transformadas con el gen marcador GUS.

Respecto a la producción, se observó una gran variabilidad entre las distintas líneas y los controles, así como en su comportamiento a lo largo de las generaciones. No obstante, los resultados muestran como en la mayoría de ellas, junto al control macropropagado, la producción aumentó en la segunda generación vegetativa. Considerando la producción media durante las 3 generaciones evaluadas, 14 de los 20 clones transgénicos, un 53%, produjo menos que el control micropropagado. Este valor fue muy similar al obtenido en las líneas regenerantes, donde 7 de las 16 líneas, 43,7%, fueron poco productivas. La disminución de la producción en las líneas transgénicas fue debida principalmente a una disminución en el peso medio del fruto. Así, se observó una alta correlación positiva entre producción y tamaño de fruto (coeficiente de correlación de Pearson de 0.751, significativo a $P=0.01$). Sin embargo, especialmente en las líneas muy poco productivas, también se observó una reducción en el número de frutos por planta. Cordero de Mesa y col. (2002) observaron que el promotor CaMV35S puede inducir una alta expresión del gen GUS en tejido reproductivo de fresa. Sin embargo, no se ha descrito que este gen marcador interfiera con la fructificación; probablemente, la disminución de la fructificación en estas líneas puede deberse a una reducción del vigor de la planta. Los resultados obtenidos en las plantas transgénicas de Carisma son similares a los descritos por

Jiménez-Bermúdez (2005) en el cv. Chandler, donde aproximadamente el 50% de las líneas transformadas con el gen GUS produjeron menos que el control, obteniéndose incluso 2 líneas que apenas produjeron frutos. De acuerdo con esta autora, la disminución de la producción en esas líneas transgénicas se puede achacar al proceso de regeneración adventicia *in vitro*.

Por otro lado, de manera similar a lo descrito para las líneas regenerantes, la aparición de filodios en frutos maduros de las líneas transgénicas de Carisma fue muy frecuente, observándose también en los frutos procedentes de los controles micro y macropropagados. Esto induce a pensar que su aparición puede estar ligada al propio genotipo más que al proceso de regeneración o transformación. Además, se observó una mayor aparición de los mismos al principio de la época de fructificación, lo cual podría indicar también una relación con la época del año y las condiciones ambientales (Ariza, 2009).

Respecto a otras anomalías observadas en los frutos, todas ellas tuvieron en común que aparecían en clones de baja productividad, y, aunque en un principio se observaron algunas deformaciones en frutos del control micropropagado, éstas desaparecieron en las siguientes generaciones, lo cual podría explicarse como consecuencia de variaciones somaclonales inducidas por el cultivo *in vitro*, que puede producir cambios fenotípicos no heredables (Kaepler y col., 2000).

La inserción de un transgén en el genoma de una planta puede acarrear pérdidas o alteraciones en la expresión de otros genes, lo que se denomina efecto de posición, con las consiguientes variaciones en el fenotipo o en el comportamiento agronómico de las plantas obtenidas (Miki y col., 2009). Esto se ha utilizado para la inducción de mutagénesis insercional en

diferentes especies, entre ellas la fresa (Oosumi y col., 2006). Además de los efectos de posición, se ha demostrado que los genes de selección pueden inducir efectos pleiotrópicos en el transcriptoma de la planta transgénica (Miki y col., 2009). Estos efectos no deseados parecen ser abundantes cuando se utiliza el gen de selección *bar*, de resistencia al herbicida bialaphos (Miki y col., 2009); sin embargo, El Quakfoui y Miki (2005) no encontraron alteraciones transcriptómicas en plantas de *Arabidopsis* que expresaban los genes *nptII* y *GUS*. Globalmente, el análisis agronómico de las líneas transgénicas de Carisma arrojó resultados similares a los descritos para las líneas de regeneración adventicia, observándose unas tasas similares de variación fenotípica tanto en el crecimiento de la planta como en la producción o la calidad del fruto. Esto sugiere, por tanto, que la mayoría de las variaciones fenotípicas observadas no son debidas ni a la inserción de los transgenes ni al proceso de transformación genética, que supone un periodo de cultivo *in vitro* más prolongado, sino a variaciones inducidas por el proceso de regeneración adventicia.

III.V Conclusiones

Se ha puesto a punto un sistema de regeneración adventicia de plantas de fresa a partir de disco de hoja. Los resultados obtenidos indican que las auxinas son cruciales en la morfogénesis de la fresa. Pero además de la relación auxinas/citoquininas, los factores medioambientales, como son una preincubación en condiciones de oscuridad y posterior cultivo a irradiancia moderada, juegan un papel importante en el proceso. Este protocolo de regeneración muestra una baja dependencia del genotipo, obteniéndose tasas de regeneración adecuadas en los cultivares Chandler y Carisma.

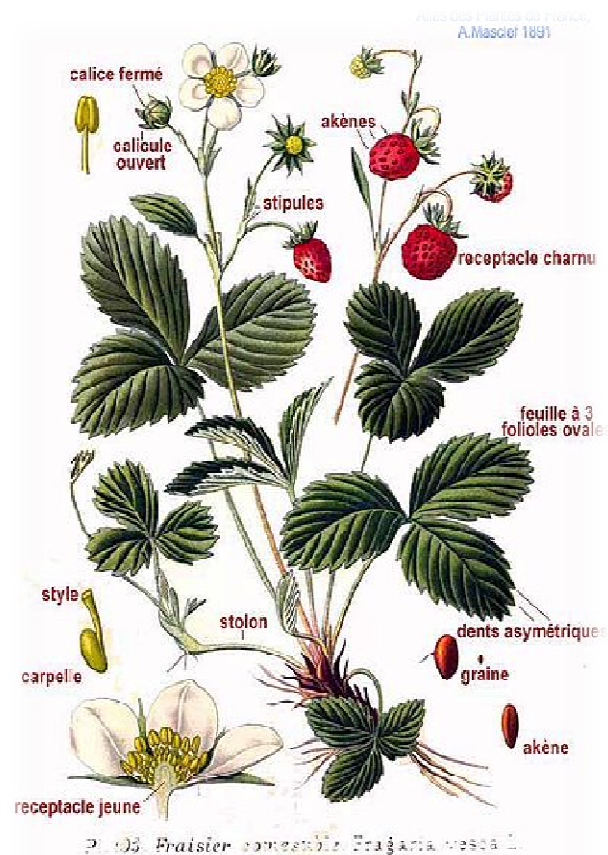
Las plantas regeneradas del cv. Carisma mostraron una variabilidad fenotípica importante, tanto en el crecimiento vegetativo, la mayoría de ellas tenían una superficie de la parte aérea inferior a la del control micropropagado, como en la capacidad de fructificación, que también disminuyó en casi la mitad de las líneas evaluadas. La disminución de la producción se debió fundamentalmente a una reducción del peso del fruto.

El sistema de regeneración adventicia de fresa puesto a punto en este trabajo se utilizó para optimizar la transformación genética del cv. Carisma mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El antibiótico utilizado para controlar el crecimiento bacteriano tuvo un efecto importante en el éxito de la transformación, debido probablemente a que estos compuestos pueden interferir en el proceso de regeneración. Así, los mejores resultados se obtuvieron con el uso de timentina 100 mg.l^{-1} , alcanzándose una frecuencia de transformación del 17%. Por otro lado, el explanto utilizado para la transformación, hoja completa, puede dar lugar a la aparición de quimeras en fases tempranas de la transformación, por lo que es necesario aplicar una selección progresiva para evitar la recuperación de falsos positivos. En este procedimiento de selección, los tallos regenerados en 25 mg.l^{-1} de kanamicina son micropropagados durante varios subcultivos en presencia de 50 mg.l^{-1} de kanamicina antes de su aclimatación.

Al evaluar morfológicamente las líneas transgénicas obtenidas, y como ocurrió con los somaclones de Carisma, se observó una gran variabilidad tanto en el área de la planta como en la capacidad de fructificación. La mayoría de las líneas tenían un área de planta inferior al control, y un 53% de ellas produjeron menos que el control micropropagado. Los frutos transgénicos, especialmente en las líneas menos productivas, presentaron una

gran variedad de anormalidades fenotípicas, siendo la más frecuente la formación de filodios. Esta anomalía, sin embargo, puede ser consecuencia del propio genotipo, ya que también se observaron filodios frecuentemente tanto en frutos de somaclones como de controles micropropagados.

La variabilidad observada en las líneas transgénicas fue de naturaleza similar a la generada en plantas procedentes de distintos eventos de regeneración, por lo que estas diferencias fenotípicas parecen estar más relacionadas con el proceso de regeneración adventicia en sí, que con el proceso de transformación, que incluiría efectos de posición debidos a la inserción del transgen. En consecuencia, dada la alta variabilidad inducida por el cultivo *in vitro* en Carisma, la utilización de la transformación genética para la mejora de este cultivar requiere obtener un número elevado de líneas transgénicas para elegir aquéllas con características morfológicas y capacidad de producción similares al control.



CAPÍTULO IV

Caracterización del papel del gen *Fxacad1*, que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa, en el proceso de maduración del fruto de fresa

IV.1. Introducción

La firmeza del fruto de fresa tiene una gran importancia desde el punto de vista económico, por sus repercusiones tanto en el mercado de fruta fresca como en el del procesado industrial (Manning, 1998). España es el quinto productor mundial de fresa tras China, Estados Unidos, México y Turquía. Aproximadamente, el 80% de la producción española destinada al consumo fresco se exporta a otros países europeos, principalmente Alemania, Francia y Reino Unido; sin embargo, entre un 5-25% de la producción se pierde cada año debido al excesivo reblandecimiento del fruto y a infecciones por patógenos fúngicos y bacterianos que suelen acompañar a este proceso. Esto, unido a que la fresa es un fruto de rápida maduración, confiere especial importancia al estudio de los factores que determinan el reblandecimiento, lo que permitirá encontrar métodos que consigan alargar la vida postcosecha.

La disminución de la firmeza del fruto de fresa viene determinada por cambios en la estructura y composición de la pared celular que ocurren durante la maduración, debido a la acción de enzimas hidrolíticas codificadas por genes específicos. En esta línea, el silenciamiento de genes codificadores de enzimas que intervienen sobre las pectinas, e.g. pectato liasa y poligalacturonasa, aumenta significativamente la firmeza del fruto (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; Quesada y col., 2009). Sin embargo, no ocurre lo mismo con genes que actúan sobre la fracción de hemicelulosa de pared, ya que no se obtuvieron resultados significativos en cuanto a variación en la firmeza de frutos procedentes de plantas transformadas con genes de celulasa silenciados (Woolley y col., 2001; Palomer y col., 2006; Mercado y col., 2010).

Además de las enzimas hidrolíticas de pared, otras proteínas también pueden afectar a la firmeza del fruto; así, Salentijn y col. (2003), en estudios de expresión génica mediante microarrays en variedades de fresa con distinto grado de firmeza, observaron que los genes que más variaban su expresión eran los relacionados con la síntesis de lignina, de modo que la variedad más firme era la que tenía una mayor expresión del gen *Fxacad1* que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), mientras que en el cultivar más blando, la expresión de un gen que codifica una cinamil alcohol reductasa (CCR), era superior. La ruta de biosíntesis de la lignina no está del todo clara (Figura 1); aun así, las diferencias en la expresión génica de *Fxacad1* se podrían relacionar con la composición de la lignina, siendo más rica en aldehidos y más susceptible a la degradación enzimática en el cultivar blando (Salentijn et al., 2003).

La lignina está formada por varios monómeros de monolignol: *p*-cumaril alcohol (lignina tipo H), coniferil alcohol (tipo G) y sinapil alcohol (tipo S), unidos con distintos tipos de enlaces, y en diferentes proporciones (Figura 1). En angiospermas, la lignina contiene principalmente monómeros G y S y una baja proporción de tipo H. La ruta biosintética de este polímero se inicia en la fenilalanina, que sufre varias hidroxilaciones, metilaciones y pasos de activación y reducción hasta producir los distintos monómeros. La reducción de los derivados cinamaldehydos, catalizada por la cinamil alcohol deshidrogenasa, es el último paso enzimático en la formación de los monolignoles. Estos monómeros son polimerizados mediante peroxidasas a través de distintos tipos de enlaces. Aunque la ruta biosintética de la lignina es compleja y difiere de unas especies a otras, se ha logrado modificar con éxito tanto el contenido como la composición de la lignina en diversas

especies vegetales mediante el control de la expresión de algunos de sus genes biosintéticos (Baucher y col., 2003). Por otro lado, es importante destacar que el *p*-cumaril-CoA se encuentra en el punto de ramificación de las rutas metabólicas que dan lugar tanto a monolignoles como a flavonoides (Figura 1).

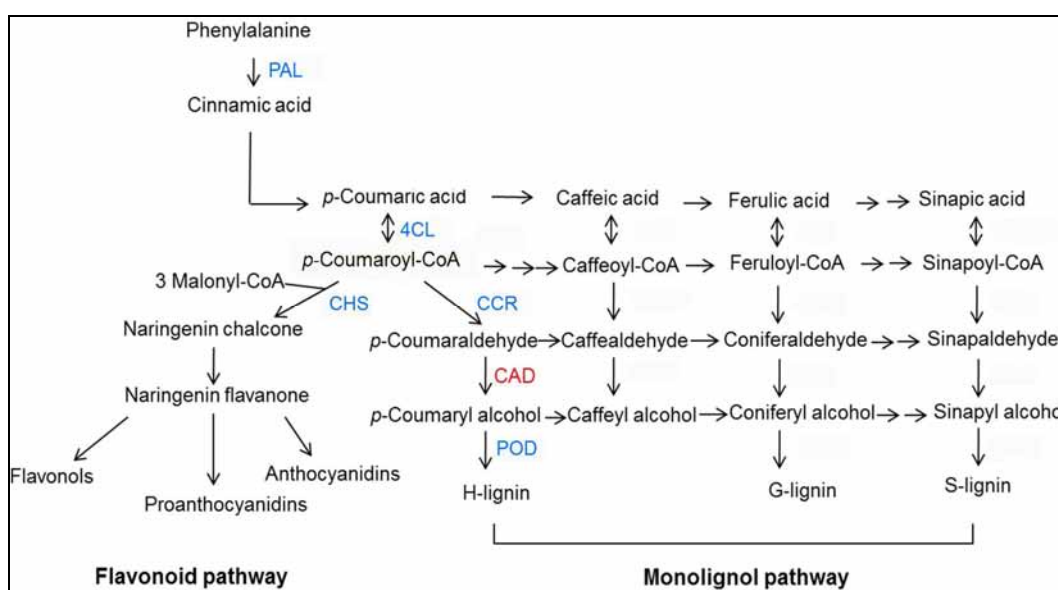


Figura 1: Ruta de biosíntesis de monolignoles y flavonoides. 4CL: 4-cumaril-CoA ligasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; CCR: cinamil alcohol reductasa; CHS: chalcona sintasa; PAL: fenilalanina amonio liasa; POD: peroxidasa. Imagen modificada de Yeh y col. (2014).

Blanco-Portales y col. (2002) analizaron el gen *Fxacad1* en fresa, observando que éste se expresa en todos los tejidos vegetativos a excepción de la raíz. En el fruto, *Fxacad1* mostró un patrón de expresión diferencial durante la maduración, detectándose los mayores niveles en fruto rojo maduro. Por otro lado, estudios de inmunolocalización del péptido FxaCAD sugieren que este gen podría estar relacionado con procesos de lignificación

(Blanco-Portales y col., 2002). En el fruto de fresa, la lignina está presente en los aquenios y en los haces vasculares que conectan los aquenios con la médula central. La cantidad de tejido vascular se ha asociado con la textura del fruto y las cualidades de sus procesados (Jewell y col., 1973). Se podría pensar, por tanto, que una sobreexpresión del gen *Fxacad1* produciría una lignina más rígida que incrementaría la firmeza del fruto. Con el objetivo de evaluar el papel de la actividad CAD en la regulación de la firmeza del fruto de fresa, se procedió a realizar un análisis funcional del gen *Fxacad1*, mediante la transformación genética de plantas de fresa con la secuencia completa de dicho gen bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1 Material vegetal y transformación genética

La secuencia codificante del gen *Fxacad1* (Blanco-Portales y col., 2002) se insertó en el vector binario PK7WG2 (Karimi y col., 2002), en posición sentido, bajo el control del promotor constitutivo 35S, utilizando la tecnología Gateway. Este plásmido contiene también el gen de selección *nptII*. El vector binario modificado se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

Para la transformación genética, discos de hoja de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch., cv. Chandler) micropropagadas en medio N₃₀K fueron inoculadas con *A. tumefaciens*, siguiendo el protocolo descrito por Barceló y col. (1998). Las plantas transgénicas se seleccionaron en 25 mg.l⁻¹ de kanamicina, y posteriormente se micropropagaron durante 3 subcultivos en presencia de 50 mg.l⁻¹, manteniéndose la presión de selección en el medio de

cultivo hasta su aclimatación. Las plantas resistentes a kanamicina se aclimataron siguiendo el protocolo puesto a punto por López-Aranda y col. (1994) y posteriormente se transfirieron al invernadero de confinamiento para su evaluación agronómica.

IV.2.2 Evaluación agronómica de las plantas transgénicas

Las líneas transgénicas obtenidas se multiplicaron *in vitro* y se aclimataron, 14 copias por línea, para ser evaluadas morfológicamente en invernadero de confinamiento durante el primer año. Tras esta primera caracterización fenotípica, se seleccionaron 6 líneas que mostraron diferente grado de expresión del gen *Fxacad1*, para ser estudiadas posteriormente durante dos años más, utilizando en estas nuevas evaluaciones 9 plantas por línea. Estas plantas se obtuvieron mediante propagación vegetativa por estolonado.

Se evaluó la producción, así como el peso, color, sólidos solubles y firmeza de frutos rojos maduros, caracteres atribuibles a la calidad del fruto. La dureza se midió en frutos rojos maduros, bien formados, con textura óptima y peso superior a cuatro gramos; para ello, se realizaron tres pinchazos por fruto con ayuda de un penetrómetro manual (Effegi). El color se evaluó con un colorímetro Minolta Chroma Metre CR-400; el aparato se calibró con placas reflectivas blancas y negras antes de su uso. Se tomaron datos del espacio de color CIELAB L^* , a^* y b^* , con tres medidas por fruto. L^* indica la luminosidad (a menor valor de L^* , más oscuro es el color), $+a^*$ es el rojo y $-a^*$ el verde, mientras que $+b^*$ es el amarillo y $-b^*$ el azul. El contenido en azúcar se midió anotando los grados Brix de los sólidos solubles con un refractómetro manual (Atago N1). Durante el primer año, se midió también el

tamaño de los frutos obtenidos anotándose el largo y ancho máximo en mm de los mismos con ayuda de un calibrador.

IV.2.3 Extracción de ARN

El ARN total se aisló de frutos control y transgénicos, en estadio rojo maduro, siguiendo el protocolo de Asif y col. (2000). Previamente, los achenios fueron eliminados manualmente, utilizándose solamente el receptáculo para la extracción y purificación del ARN. El ARN obtenido se trató con RNase free DNase I (Invitrogen) y se purificó mediante el kit RNeasy Mini (Qiagen). La concentración de ARN y su pureza se evaluaron mediante el espectrofotómetro Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) y por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

IV.2.4 Análisis de expresión de *Fxacad1* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR)

Los análisis de expresión del gen *Fxacad1* se realizaron mediante QRT-PCR utilizando el sistema iCycler (BioRad), como se describe en Benítez-Burraco y col. (2003). Las secuencias de los primers para la amplificación del gen *Fxacad1* fueron 5'-GTTGGAGACAGAGTCGGTGTTG-3' y 5'-CATCAAGAGGCAAGTTGTCTGG-3'. Cada reacción se realizó por triplicado y los valores de Ct se normalizaron con respecto al valor de Ct correspondiente al gen espaciador 26S-18S RNA de fresa (Benítez-Burraco et al., 2003; Cumplido-Laso et al., 2012; Molina-Hidalgo et al., 2013). Estos valores fueron usados posteriormente para determinar la expresión relativa del gen *Fxacad1* de acuerdo con Pedersen (2001). Utilizándose como gen de control el gen espaciador 26S-18S (primers:

5'-ACCGTTGATTTCGCACAATTGGTCATCG-3' y 5'-TACTGCGGGTCGGCAATCGGACG-3'), debido a su expresión constitutiva en fresa.

IV.2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (versión 15). Previamente a la realización del ANOVA, se analizó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. La separación de medias se llevó a cabo con el test de Tukey, en el caso de varianzas homogéneas, o T2-Tamhane, para las varianzas no homogéneas. En todos los casos se aplicó una $P=0,05$.

IV.3. Resultados

IV.3.1 Obtención de plantas transgénicas

Para la generación de las plantas transgénicas de fresa, se inocularon unos 300 explantos de discos de hoja con *A. tumefaciens* AGL1 portando el plásmido PK7WG2, conteniendo la secuencia codificante del gen *Fxacad1*. Tras varios meses de cultivo, se obtuvieron más de 100 líneas transgénicas independientes en medio de selección suplementado con 25 mg.l⁻¹ de kanamicina. La frecuencia final de transformación fue del 34,3%, estimada como el número de total de explantos que regeneraron en medio de selección a las 20 semanas de cultivo dividido por el número de explantos inoculados. Los brotes obtenidos fueron micropropagados, al menos durante tres subcultivos, a concentraciones superiores de kanamicina, 50 mg.l⁻¹, para asegurar la ausencia de escapes.

De todas las líneas transgénicas independientes obtenidas se seleccionaron 24 en base a su aspecto y capacidad de multiplicación *in vitro*, aclimatándose posteriormente en alveolos con una mezcla de sustrato 1 y perlita, en túnel de aclimatación (Figura 2).



Figura 2. A: aspecto de una colonia de brotes adventicios regenerados en medio $N_{30}K$ suplementado con 25 mg.l^{-1} de kanamicina, a partir de discos de hoja inoculados con el plásmido pK7WG2 conteniendo la secuencia codificante del gen *Fxacad1*. B: plantas de fresa transformadas con el gen *Fxacad1*, aclimatadas en bandejas de alveolos con una mezcla de sustrato 1 y perlita.

IV.3.2 Primera evaluación fenotípica de las líneas transgénicas

Tras su aclimatación, las plantas transgénicas se mantuvieron en invernadero para su endurecimiento junto a un control micropropagado del cv. Chandler (Figura 3A). En general, no se observaron alteraciones morfológicas en las líneas transgénicas en cuanto al crecimiento, porte, número de hojas o morfología foliar, siendo el aspecto general de las plantas bueno, presentando un color verde intenso y vigor adecuado. Posteriormente, se trasladaron a macetas de mayor tamaño, y se colocaron en invernadero de confinamiento (Figuras 3B, 3C) para realizar su caracterización morfológica.



Figura 3. Cultivo en invernadero de las plantas de fresa transformadas con el gen *Fxacad1*, para su evaluación morfológica. A: aspecto de las plantas tras su aclimatación, cultivadas en macetas de 9 cm de diámetro. B: aspecto de las plantas en fase de producción, cultivadas en macetas de 25 cm de diámetro. C: imagen de la línea Cad9 durante su evaluación morfológica.

La producción de frutos durante el primer año de muestreo fue muy irregular. La fructificación fue muy escasa en 7 de las 25 líneas analizadas; tres de ellas (Cad30, 39 y 120) no produjeron ningún fruto, mientras que otras 4 líneas (Cad7, 8, 26 y 103) produjeron menos de 10 frutos por planta. El resto de líneas dieron una producción similar a la de los controles procedentes de plantas micropropagadas.

Las características morfológicas de los frutos rojos durante el primer año en invernadero de confinamiento (generación F0), se muestran en la Tabla 1. Siete líneas, Cad13, 14, 20, 31, 32, 101 y 111, dieron frutos con un peso ligeramente inferior al de los frutos control de plantas no transformadas. En cuanto al tamaño de fruto, el largo siempre fue inferior al del control en todas las líneas evaluadas, produciendo además las líneas 31 y 111, frutos con el largo y ancho también inferiores al control. Los sólidos solubles obtenidos en cinco líneas (6, 13, 24, 25 y 31), dieron un contenido en grados Brix significativamente superior al del control Chandler.

Tabla 1. Evaluación morfológica de frutos rojos maduros en plantas de fresa, cv. Chandler, transformadas con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1* durante el primer año de evaluación en invernadero de confinamiento (F0). El (*) indica que existen diferencias significativas con respecto al control no transformado mediante el test T2 Tamhane para todas las variables, a excepción de los parámetros de color L* y b*, donde se aplicó el test de Tukey, ambos a P=0.05.

Línea F0	Peso (g)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Sólidos Solubles (°Brix)	Color		
					L*	a*	b*
Control	13,2±5,8	37,7±7,2	28,5±4,6	8±1,9	36,2±2,0	39,6±3	21,4±3,2
1	12,3±6,4	34,1±6,4	28,6±5,6	7,5±1,0	36,7±2,6	38,7±3,1	20,7±3,0
5	12,7±4,9	35,3±6,4	29,8±4,4	9,1±1,9	35,7±1,9	39,6±2,3	20,0±2,8
6	13,6±5,4	36,3±6,2	29,7±4,9	9,9±2,4*	36,3±2,1	38,4±3,0	20,5±2,7
9	11,8±4,6	34,6±6,1	27,6±4,4	8,3±1,8	35,5±2,0	39,5±2,7	20,5±2,9
13	9,2± 2,9*	30,5±4,4*	26,8±3,7	9,8±2*	36,1±2,4	40,2±2,7	21±3
14	9,5±4*	32,3±6,1*	26,3±4,2	9,1±1,7	35,7±2,2	39,8±2,7	20,8±3,1
15	11,2±4,9	35,2±6,9	26,7±4,4	8,9±1,8	37,1±2,3	40,9±3	22,2±4,0
20	9,6±2,8*	30,9±4,5*	27,2±3,3	9,1±2,4	36,5±2,4	38,9±3,1	21,0±3,8
24	9,3±4,1	30,8±4,9*	28±5,4	9,7±1,4*	39,6±2,6*	42,6±1,8*	25,2±3,4*
25	11,9±5,3	35,5±5,6	27,5±4,7	9,6±1,7*	35,6±2,4	41,1±3,7	21,4±3,8
31	10,7±4,2*	35,0±5,3*	25,8±4,2*	8,9±1,8*	35,6±2,3	39,3±2,9	21±3,1
32	10,3±3,0*	35,9±5,9	26,1±3,4	8,5±2	36,7±2,9	40,1±2,9	21,6±3,3
37	11,3±4	35,6±5,5	27,2±3,9	7,8±1,7	36,9±3,1	37,6±3,3	21,7±3,7
40	12,7±4,5	38,5± 6,2	27,7±3,9	7,6±1,4	36,1±2,2	38,4±2,8	21,0±3,1
101	9,1±2,2*	31,6±3,7*	26,2±2,4	9,1±2	37,0±3,3	38,9±2,6	21,7±4,4
108	12,4±1,8	35,9±3,2	28,8±1,7	7,9±1,4	39±2,1*	40,0±1,9	23,9±2,2
111	10±4,6*	33,5±6,2*	25,7±4,3*	8,5±1,4	36,4±2,0	40,0±2,7	22,2±3

En relación con el color, no se observaron diferencias significativas entre las distintas líneas estudiadas y el control, para este parámetro, a excepción de la línea 24 que dio valores de L^* , a^* y b^* superiores al control, produciendo fresas más rojas que los frutos Chandler no transformados.

La firmeza en los frutos maduros se estimó con un penetrómetro manual. Todas las líneas en las que se obtuvo suficiente número de frutos para evaluar mostraron valores de firmeza similares, variando entre 206,4 g (línea Cad108) y 291,5 (línea Cad40) (Figura 4). En la mayoría de las líneas, estos valores medios fueron ligeramente inferiores a la firmeza de los frutos testigo, siendo estas diferencias significativas en las líneas Cad6, 9, 15, 20, 25 y 31. La disminución media de la firmeza en estas 6 líneas transgénicas con respecto al control fue del 20,8%.

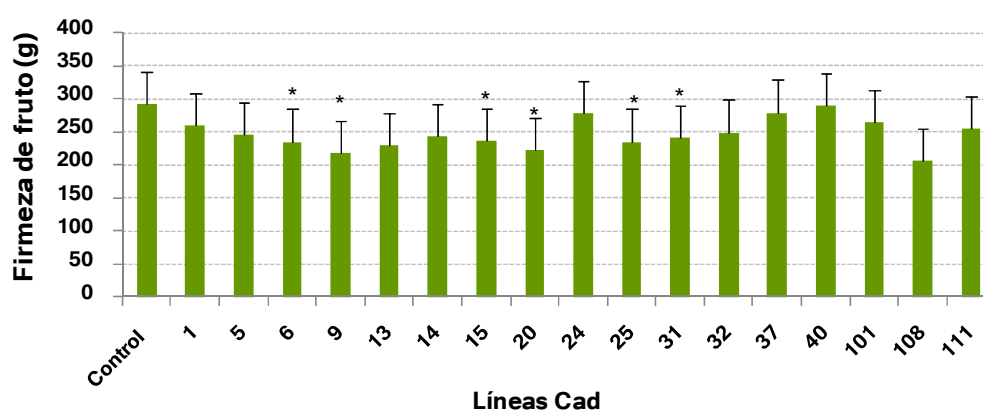


Figura 4. Firmeza de frutos rojos maduros en plantas de fresa, cv. Chandler, transformadas con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1*, durante el primer año de evaluación en invernadero de confinamiento (F0). El (*) indica diferencias significativas con respecto al control no transformado mediante el test T2 Tamhane a $P=0.05$.

IV.3.3 Análisis molecular de las líneas Cad

Los niveles de expresión del gen *Fxacad1* se evaluaron en frutos rojos maduros de 11 líneas independientes, recolectados durante el primer año de evaluación en invernadero, mediante QRT-PCR. Tan sólo en la línea Cad20, se observaron niveles de expresión mayores que en el control sin transformar (Figura 5). Por el contrario, 7 de las líneas analizadas (Cad5, 6, 9, 25, 40, 103 y 108) mostraron un importante silenciamiento del gen, mayor del 95%, debido probablemente a un fenómeno de co-supresión. En las líneas Cad15, 31 y 37, los niveles de expresión fueron similares o ligeramente inferiores al control.

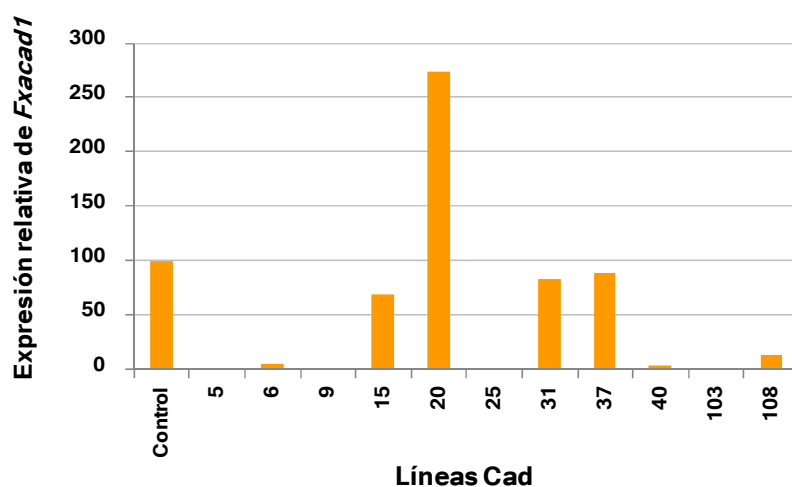


Figura 5. Niveles de expresión relativos del gen *Fxacad1* en frutos rojos maduros de plantas de fresa, cv. Chandler, transformadas con la secuencia en sentido de dicho gen, recolectados durante el primer año de evaluación en invernadero de confinamiento (F0).

En base a estos resultados, se seleccionaron 6 líneas que presentaban diferente grado de expresión del gen *Fxacad1*. Por un lado, las líneas Cad9,

25, 40 y 103, con un fuerte silenciamiento del gen (superior al 95%); por otro, la línea Cad15, con niveles de expresión similares al control, y finalmente, la línea Cad20 con niveles de expresión superiores al control. Estas líneas se evaluaron fenotípicamente durante dos años adicionales.

IV.3.4 Evaluación fenotípica de las líneas Cad seleccionadas

No se observaron grandes diferencias fenotípicas entre las líneas seleccionadas y el control no transformado. Las plantas tenían en general buen aspecto, aunque la línea Cad20 presentaba plantas con un porte algo inferior. En la Figura 6, aparece una imagen del control Chandler mantenido en invernadero de confinamiento.



Figura 6. Imagen de las plantas control, cv. Chandler, de las líneas Cad seleccionadas mantenidas en invernadero de confinamiento.

A continuación, se muestra un detalle de las distintas líneas transgénicas seleccionadas (Figura 7).

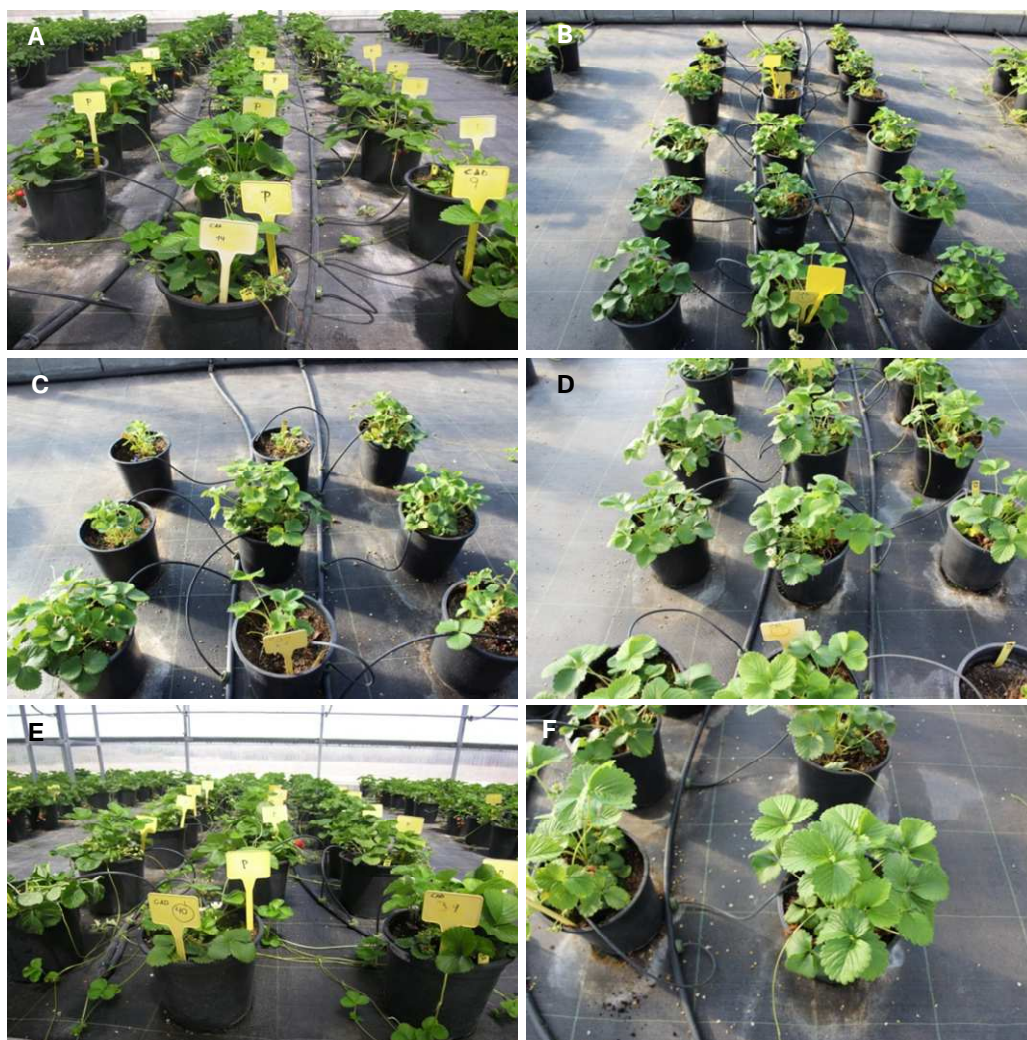


Figura 7. Aspecto de las líneas transgénicas Cad seleccionadas, transformadas con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1*. A: Cad9. B: Cad15. C: Cad20. D: Cad25. E: Cad40. F: Cad103.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de los frutos maduros durante el segundo año de cultivo en invernadero de confinamiento (generación F1). El peso de los frutos fue, en todos los casos,

inferior al obtenido en el control no transformado, destacando las líneas Cad20, 25, 40 y 103 por producir frutos significativamente de menor peso. Lo mismo ocurrió con el calibre, teniendo las líneas Cad20, 25, 40 y 103 una longitud significativamente inferior a la de los frutos control. En cuanto al contenido de sólidos solubles, no se observaron diferencias significativas con el control, a excepción de la línea Cad25 que mostró valores de SS significativamente superiores.

Tabla 2. Evaluación morfológica de frutos rojos maduros en plantas de fresa, cv. Chandler, transformadas con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1*, evaluadas durante el segundo año en invernadero de confinamiento (F1). Las líneas seleccionadas, se obtuvieron a partir de la F0 mediante estolonado. El (*) indica diferencias significativas con respecto al control no transformado por test T2 Tamhane a $P=0.05$.

Línea F1	Peso (g)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Sólidos Solubles (°Brix)	Color		
					L*	a*	b*
Control	14,0±5,4	40,1±7,4	28,5±4,0	7,3±1,4	34,1±2,4	39±2,4	21,1±3,3
9	11,2±4,5	37,4±4,7	25,7±4,1	8±2,1	34,5±3,5	38,7±4,2	20,2±4,4
15	12,5±5,0	37,9±5,9	27,4±4,2	7,7±1,8	35,3±3,5*	40±3,3*	20,9±3,8
20	10,9±3,9*	35,1±4,9*	26,7±4,2*	7,5±1,7	34,6±3,1	38,2±4,1	20,4±4,8
25	10,2±2,6*	36,2±3,8*	25,8±3,2*	8,8±1,4*	34,1±3,5	39,9±2,9*	21,2±3,1
40	10,6±4,5*	36,6±5,6*	25,0±4,5*	7,7±1,8	34,1±3,0	39,6±3,2	21,1±3,5
103	9,2±4,4*	33,7±7,6*	24,8±5*	8,2±2,2	37,3±4,1*	37,5±4,1	22,0±5

Los resultados en cuanto al color de los frutos fueron muy similares, sólo la línea Cad15 presentó diferencias significativas en L^* y a^* , la 25 en a^* y la 103 en L^* .

Los datos de firmeza obtenidos en frutos rojos maduros durante el segundo año de cultivo de las plantas en invernadero de confinamiento se muestran en la Figura 8. En general, la firmeza aumentó ligeramente en los frutos de todas las líneas evaluadas en el segundo año (F1), con respecto a la obtenida en la F0. Sin embargo, todas las líneas analizadas mostraron de nuevo valores de firmeza de fruto menores que el control, siendo las diferencias estadísticamente significativas en las líneas Cad15, 20, 25 y 40. No se observó correlación entre la firmeza y el grado de silenciamiento del gen. El valor medio de firmeza en las 6 líneas seleccionadas fue de $293,5 \pm 17,7$ g, un 18,6% menor del obtenido en los frutos control.

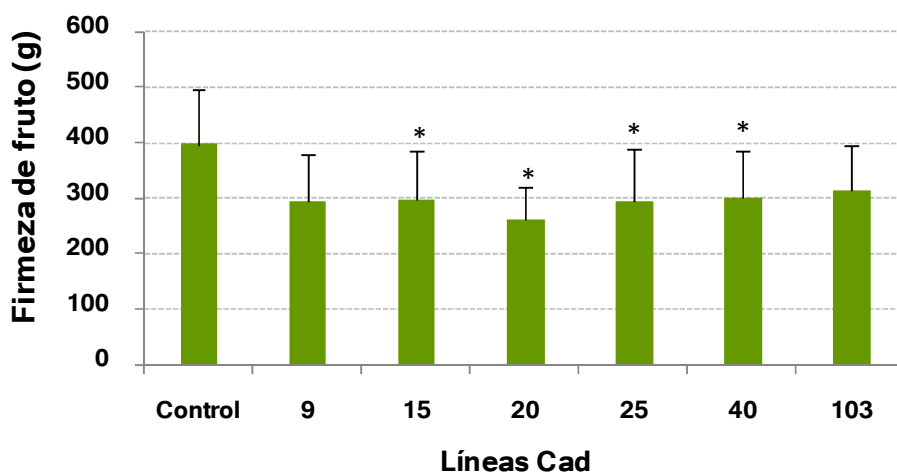


Figura 8. Firmeza de frutos rojos maduros en plantas de fresa, cv. Chandler, transformados con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1* durante el segundo año de evaluación en invernadero de confinamiento (F1). El (*) indica diferencias significativas con respecto al control no transformado por test de T2 Tamhane a $P=0.05$.

Los resultados obtenidos en el tercer año de muestreo (generación F2) se recogen en la Tabla 3. En cuanto al peso de fruto, las líneas Cad9, 15, 40 y 103 dieron valores iguales o ligeramente inferiores al control, no siendo, sin embargo estas diferencias significativas. Por el contrario, las líneas 20 y 25 produjeron frutos con un peso significativamente inferior al del control. Además, los frutos de estas dos líneas presentaron también un calibre significativamente menor al de los controles. Por otro lado, la línea Cad25 destacó por tener un contenido en sólidos solubles superior al resto de líneas. En cuanto al color de los frutos evaluados, no se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

Tabla 3. Evaluación morfológica de frutos rojos maduros en plantas de fresa, cv. Chandler, transformadas con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1*, durante el tercer año de evaluación en invernadero de confinamiento (F2). Las líneas seleccionadas, se obtuvieron mediante estolonado, a partir de la F1. El (*) indica diferencias significativas con respecto al control no transformado mediante el test T2 Tamhane para todas las variables, a excepción de los parámetros de color donde se aplicó el test de Tukey, ambos a $P=0.05$.

Línea F2	Peso (g)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Sólidos Solubles (°Brix)	Color		
					L*	a*	b*
Control	9,7±4,0	34,8±0,7	24,7±0,4	7,5±1,9	35,9±2,5	36,8±3,9	20,2±3,4
9	10,2±3,8	36,7±0,6	24,9±,4	7,5±1,4	36,4±3,8	37,2±4,7	21,3±4,3
15	9,8±3,4	36,0±0,6	24,4±0,4	7,7±2	36,1±2,8	37,4±3,7	21,7±3,6
20	7,3±2,2*	31,1±0,4*	22,5±0,3*	7,2±1,9	37,1±3,4	38±3,8	21,9±4,8
25	7,9±2,6*	32±0,5*	23,2±0,3	8,4±2,1*	36,5±7,3	37,2±5,7	20,7±4,8
40	8,5±3,8	33,6±0,5	23,1±0,4	7,5±1,9	35,8±2,8	37,9±3,6	21,5±4,1
103	8,7±3,1	32,9±0,6	24,3±0,3	7,6±1,0	37,8±3,3	36,8±4,5	22,2±4,1

De manera similar a lo observado en el segundo año de evaluación fenotípica, la firmeza del fruto maduro no se correlacionó con el grado de expresión del gen *Fxacad1*. La firmeza evaluada en los frutos maduros durante el último año de evaluación en invernadero de confinamiento (F2), se muestra en la Figura 9. En general, todas las líneas mostraron valores de firmeza de fruto similares o ligeramente inferiores al control, si bien las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el caso de la línea Cad20, que fue la que mostró una pequeña sobreexpresión del gen.

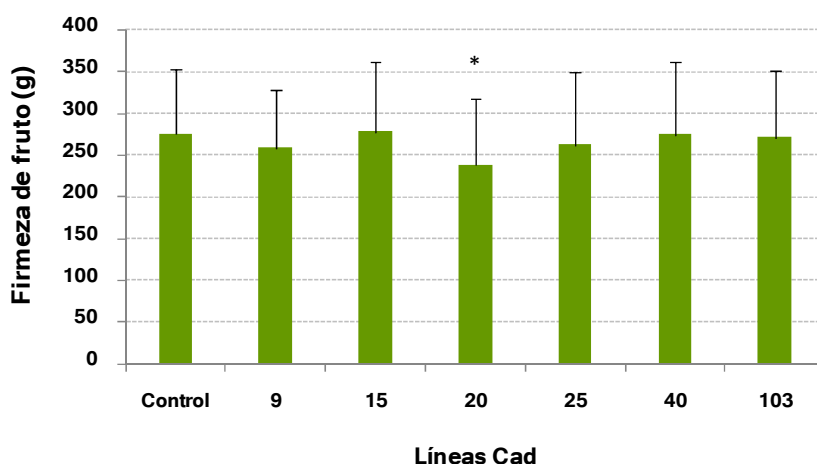


Figura 9. Firmeza de frutos rojos maduros en plantas de fresa, cv. Chandler, transformados con la secuencia en sentido del gen *Fxacad1* durante el tercer año de evaluación en invernadero de confinamiento (F2). El (*) indica diferencias significativas con respecto al control no transformado por test de Tukey a $P=0.05$.

La figura 10 muestra el aspecto de frutos obtenidos en algunas de las líneas transgénicas seleccionadas.

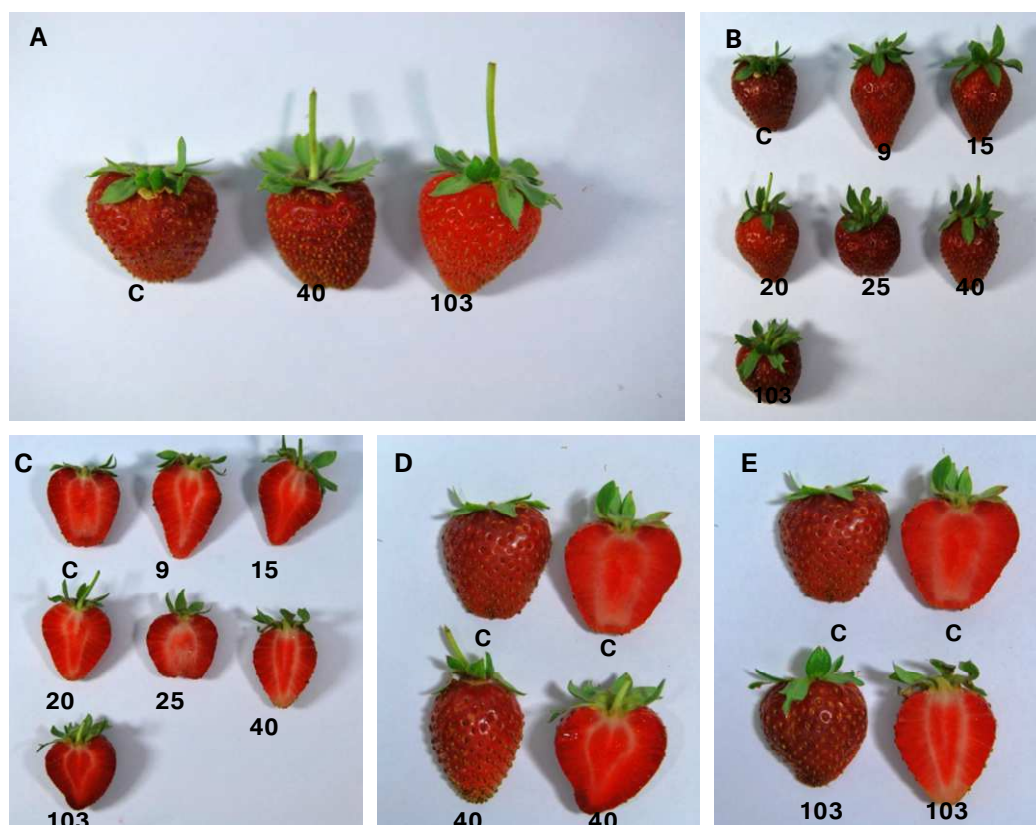


Figura 10. Aspecto de frutos rojos maduros de algunas de las líneas transgénicas seleccionadas. De izquierda a derecha, A: imagen de un fruto control junto a frutos de las líneas Cad40 y 103. B: detalle de frutos cerrados (B) y abiertos (C) pertenecientes al control y las líneas Cad9, 15, 20, 25, 40 y 103. D: comparativa de frutos cerrados y abiertos correspondientes al control y a la línea Cad40. E: frutos cerrados y abiertos procedentes de plantas control y Cad103.

IV.4. Discusión

El reblandecimiento de los frutos carnosos es un proceso complejo que no es del todo conocido. Está ampliamente aceptado que el desmantelamiento de la pared y la disminución de la adhesión celular, debido a la disolución de la lámina media, son los principales factores que determinan el reblandecimiento del fruto (Brummell y Harpster, 2001; Mercado y col., 2011).

Estos cambios están promovidos por enzimas hidrolíticas, o proteínas como la expansina, que modifican los principales polímeros de pared. En el caso concreto de la fresa, se ha comprobado que el silenciamiento de genes pectinolíticos específicos de fruto, e.g. pectato liasa y poligalacturonasa, promueve cambios importantes en la composición y características de las pectinas de la pared celular, lo que se traduce en una disminución del reblandecimiento y una mayor vida postcosecha del fruto (Posé y col., 2013; Posé y col., 2015). A diferencia de lo que ocurre con las pectinas, la modificación de la hemicelulosa de la pared celular no modifica sustancialmente la textura del fruto (Woolley y col., 2001; Palomer y col., 2006; Mercado y col., 2010).

La lignina es el segundo componente natural más abundante después de la celulosa. Está presente en la pared celular de tejidos lignificados, participando en el transporte de agua y nutrientes así como en la defensa de la planta frente a agentes bióticos y abióticos. En algunos frutos carnosos como la manzana, pera o níspero, se ha observado un incremento de los niveles de lignina durante la maduración y el almacenamiento (Martín-Cabrejas y col., 1994; Marlett, 2000; Cai y col., 2006). En estos frutos, el proceso de lignificación podría resultar en un incremento de la firmeza de la pulpa. Así, Shan y col. (2008) encontraron que en frutos de níspero de la variedad Luoyangqing almacenados durante 10 días a 20°C, se observaba un incremento en la firmeza paralelo a un incremento en el contenido en lignina; por el contrario, frutos de la variedad Baisha almacenados en las mismas condiciones sufrían una disminución de la firmeza sin que variara el contenido en lignina. Tanto la expresión de genes CAD y POD, como la actividad de ambas enzimas se incrementaba en la variedad más firme durante el

almacenamiento, pero apenas si variaban en la variedad blanda (Shan y col., 2008).

De manera similar a lo observado en níspero, en fresa, Salentijn y col. (2003) encontraron una expresión diferencial de los genes CCR y CAD entre los cultivares Holiday y Gorella, siendo la expresión del gen CAD superior en el cultivar Holiday, más firme, y por el contrario, la expresión de CCR mayor en Gorella, cultivar más blando. La lignina en la fresa se ha detectado en los aquenios y en el tejido vascular que conecta los aquenios con la médula (Suutarinen y col., 1998). Recientemente, Yeh y col. (2014) observaron que el incremento en la firmeza de frutos de fresa, en respuesta a la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, se correlacionaba con un incremento en la lignificación del tejido vascular del receptáculo agroinfiltrado. Por tanto, la modificación de la cantidad y/o composición de la lignina mediante la manipulación de genes clave de la vía metabólica de su síntesis, como los genes CAD, podría modificar la firmeza del fruto. Con este fin, en este trabajo se han obtenido plantas transgénicas de fresa conteniendo la secuencia codificante del gen *Fxacad1*.

La tasa de transformación obtenida tras varios experimentos fue excepcionalmente alta, muy superior al 5-10% que suele ser habitual en el cv. Chandler usando el protocolo desarrollado por Barceló y col. (1998). A pesar de que se transformó con el gen *Fxacad1* en sentido, la mayoría de las líneas transgénicas obtenidas mostraron un fuerte silenciamiento del gen. Este fenómeno denominado co-supresión es relativamente frecuente, incluso en plantas transgénicas conteniendo una sola copia del gen, cuando se utiliza un promotor fuerte, como el CaMV35S, para expresar los transgenes en la planta. Fenómenos similares de co-supresión se han observado en este

mismo cultivar por Youssef y col. (2009), al introducir un gen de pectato liasa en sentido, y en el cv. Calypso por Woolley y col. (2001) tras la transformación con un gen que codifica una endo- β -1,4-glucanasa. Los niveles de silenciamiento del gen *Fxacad1* en frutos rojos maduros en 7 de las 11 líneas evaluadas fueron superiores al 90% por lo que es esperable que estos frutos tengan una menor actividad CAD, si bien esto tiene que ser corroborado experimentalmente. Tan sólo una de las líneas transgénicas mostró una ligera sobreexpresión del gen.

En plantas transformadas con genes de la vía de síntesis de lignina, la reducción o modificación del contenido de este polímero en la pared celular podría causar efectos pleiotrópicos, debido al importante papel que juega la lignina en la fisiología de la planta (e.g. rigidez mecánica de los tejidos, transporte de agua y solutos vía xilema, banda de Caspary). En tabaco, líneas transgénicas con un fuerte silenciamiento del gen CCR mostraron un crecimiento reducido (Boudet, 2000); sin embargo, Zhong y col. (1998) no observaron alteraciones del crecimiento en plantas transgénicas de tabaco con una Cafcoil-coenzima A metiltransferasa silenciada, a pesar de que las plantas presentaban una importante reducción en el contenido en lignina. De la misma forma, plantas doble transgénicas CCR/CAD, con menor contenido en lignina, mostraron un fenotipo normal (Boudet, 2000). En general, en las líneas transgénicas de fresa no se observaron variaciones morfológicas destacables a pesar del fuerte silenciamiento del gen *Fxacad1*, con la excepción de una línea que presentaba menor crecimiento. El gen *Fxacad1* se expresa en todos los tejidos vegetativos a excepción de la raíz, si bien tanto el patrón como los niveles de expresión en fruto sugieren que está

relacionado con la maduración, por lo que su silenciamiento en el resto de tejidos de la planta podría tener un impacto menor.

En general, no se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados en los frutos maduros de las líneas transgénicas seleccionadas, a excepción de una ligera disminución del peso y tamaño del fruto en alguna de las líneas. Sin embargo, la reducción del peso de fruto no se correlacionó con el nivel de expresión del gen, lo que sugiere que este efecto podría ser debido a variaciones inducidas durante el cultivo *in vitro*. Por otro lado, puesto que la vía de flavonoides y monolignoles comparten el mismo precursor, p-coumaril-CoA, al bloquear o reducir la síntesis de lignina podría esperarse una mayor acumulación de antocianos al desviarse el flujo de carbono hacia esa vía. El efecto contrario se ha observado cuando el flujo de carbono hacia los flavonoides está limitado al inhibir la chalcona sintasa (Lunkenbein y col., 2006; Ring y col., 2013). Aunque los niveles de antocianos no se han medido en las plantas transgénicas, la ausencia de variaciones significativas en el color de los frutos transgénicos con respecto al control sugiere que el contenido de flavonoides no se ha modificado al silenciar el gen *Fxacad1*.

En cuanto a la firmeza de fruto, ésta fue inferior a la de los frutos controles en todas las líneas seleccionadas en las dos primeras generaciones evaluadas, y similar o ligeramente inferior al control en la tercera generación. Se podría pensar, por tanto, que el silenciamiento del gen reduce la firmeza de fruto maduro; sin embargo, no se encontró correlación entre nivel de expresión del gen *Fxacad1* y firmeza, de tal forma que líneas con niveles de expresión similar o superior al control también mostraron una pequeña reducción en la firmeza. Estos resultados sugieren que *Fxacad1* no participa, o

tiene un papel menor, en los cambios en textura que sufre la fresa durante su maduración. Sin embargo, sería necesario determinar los niveles de actividad CAD, así como el contenido en lignina, en los frutos transgénicos para corroborar esta hipótesis. Adicionalmente, la actividad CAD en frutos de fresa parece estar codificada por una pequeña familia génica (Blanco-Portales y col., 2002), por lo que la pérdida de función de *Fxacad1* podría estar compensada por otro gen de esta familia.

Yeh y col. (2014) realizaron estudios funcionales de los genes *FaCCR*, *FaCAD* y *FaPOD* en frutos de fresa mediante su silenciamiento o sobreexpresión transitoria mediante agroinfiltración. La proteína codificada por *FaCAD* comparte un 98.1% de identidad con *Fxacad1*. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes puesto que el proceso de agroinfiltración, independientemente de la construcción empleada, incrementó tanto la firmeza de fruto como el contenido en lignina, probablemente como respuesta del fruto a la infección por el patógeno. Así, los incrementos en firmeza de los frutos agroinfiltrados con un RNAi de *FaCAD* para su silenciamiento o con la secuencia del gen en sentido para su sobreexpresión, fueron similares entre sí y parecidos al obtenido en frutos agroinfiltrados con el plásmido pBI. Lo mismo ocurrió con el contenido en lignina, si bien en los frutos agroinfiltrados con el RNAi, el silenciamiento del gen modificó la calidad de la misma, disminuyendo en un 58% los monómeros de tipo H. Estos resultados no son inusuales, puesto que en la mayoría de trabajos donde se han silenciado genes CAD, no se observaron variaciones en la cantidad total de lignina, pero sí en su composición monomérica (Singh y col., 2010). De acuerdo con Humphreys y Chapple (2002), el proceso de lignificación es suficientemente

plástico para permitir que plantas con el gen CAD silenciado formen lignina a partir de hidroxí cianamilaldehídos.

A pesar de que los resultados de Yeh y col. (2014) en cuanto al papel de los genes CCR y CAD no fueron concluyentes, estos autores sostienen que existe una correlación entre firmeza y contenido en lignina, ya que la infección con *Agrobacterium* aumenta ambos parámetros. El incremento en lignina en los frutos agroinfiltrados podría deberse no a un aumento del contenido en monolignoles en respuesta a la infección, ya que no se observó inducción de la expresión de los genes *FaCAD* y *FaCCR* tras la agroinfiltración, sino a la polimerización de los monolignoles al aumentar fuertemente la expresión del gen *FaPOD27*, que codifica una peroxidasa, como respuesta a la infección por el patógeno (Ring y col., 2013; Yeh y col., 2014).

Nuestros resultados con plantas transgénicas estables con bajos niveles de expresión *Fxacad1* sugieren que este gen no tiene un papel relevante en la firmeza del fruto de fresa. De manera similar, Gabotti y col. (2015) encontraron que la actividad CAD no estaba relacionada ni con la lignificación ni con la firmeza del fruto de melocotón. ¿Cuál podría ser por tanto el papel de este gen durante la maduración del fruto? Mitchell y Jelenkovic (1995) sugirieron que la actividad CAD podría intervenir en la formación de compuestos volátiles responsables del aroma de la fresa madura. En este sentido, resultados preliminares de la composición de volátiles en alguna de las líneas transgénicas con *Fxacad1* silenciado mostraron un perfil de compuestos volátiles diferente al del control. Estas diferencias podrían deberse a un efecto directo del silenciamiento del gen,

aunque también podría tratarse de un efecto indirecto al reconducirse el flujo de carbono hacia otros compuestos tras el bloqueo de la actividad CAD.

IV.5 Conclusiones

Se han obtenido plantas transgénicas conteniendo el marco abierto de lectura del gen *Fxacad1*; sin embargo, en la mayoría de las líneas se produjo una cosupresión del gen, alcanzándose niveles de silenciamiento en frutos maduros superiores al 90%. La fuerte supresión de este gen no afectó al crecimiento de la planta ni, en general, a la calidad de los frutos en cuanto al peso, forma, color o sólidos solubles. En cuanto a la firmeza de fruto, ésta fue ligeramente inferior al control en la mayoría de las líneas, si bien no se encontró correlación entre el nivel de expresión del gen *Fxacad1* y la firmeza. Los resultados obtenidos no parecen indicar que *Fxacad1* tenga un papel especialmente relevante en la textura del fruto de fresa; sin embargo, y dado que su expresión aumenta considerablemente durante la maduración del fruto, podría ser que este gen interviniera en otros aspectos del proceso, como son los relacionados con el aroma del fruto.



CAPÍTULO V

Aislamiento y cultivo de protoplastos en el cultivar de fresa Chandler. Evaluación morfológica de los protoclonos obtenidos

V.1. Introducción

Los protoplastos son células aisladas desprovistas de su pared, con potencial para regenerarla, desdiferenciarse, dividirse y proliferar hasta formar un callo del que se puedan regenerar plantas completas. Además de su totipotencia, la posibilidad de acceder a la membrana plasmática hace que los protoplastos sean un material idóneo para la manipulación genética. Por tanto, son una herramienta biotecnológica clave para inducir transferencia génica directa o hibridación somática, de gran importancia en programas de mejora. Así, es posible crear combinaciones génicas únicas de núcleos y/o orgánulos citoplasmáticos, siendo la obtención de híbridos asimétricos y cíbridos la principal aplicación de la fusión de protoplastos (Li y col., 1999; Geerts y col., 2009). Además, los protoplastos se han empleado en numerosos estudios sobre estructura celular, función de membrana, síntesis de productos farmacéuticos y evaluación toxicológica (Davey y col., 2005).

Por otra parte, y partiendo de la idea de que la variación obtenida en plantas derivadas del cultivo de protoplastos es mucho mayor que la de aquéllas que proceden de cultivos con crecimiento organizado (Karp, 1993), el cultivo de protoplastos puede tener un enorme valor como fuente generadora de variación somaclonal, ampliando el germoplasma existente por un lado y, por otro, creando variación que pueda ser utilizada dentro de los programas de mejora. No obstante, en fresa son muy escasos los trabajos publicados sobre el cultivo de protoplastos, mereciendo especial consideración las investigaciones realizadas por Nyman y Wallin (1988, 1992a).

El aislamiento de protoplastos parece un proceso sencillo, se trata de eliminar la pared celular mediante enzimas que hidrolizan los polisacáridos y mantener los protoplastos en un medio donde el efecto de la desaparición de la pared sea contrarrestado por una presión osmótica apropiada; sin embargo, en la práctica, es un fenómeno complejo donde existe un gran número de

factores interrelacionados entre sí, que hacen que el proceso de aislamiento, crecimiento y regeneración de protoplastos tenga como principal característica su falta de reproducibilidad (Andreu y col., 2008), y como consecuencia, las condiciones óptimas varían no sólo entre especies, sino también entre variedades cercanas, existiendo incluso casos donde es completamente imposible obtener protoplastos viables (Warren, 1991; Davey y col., 2005; Andreu y col., 2008). El mantenimiento y cuidado de las plantas antes del aislamiento de los protoplastos es crucial, de modo que, plantas crecidas en condiciones subóptimas raramente permitirán obtener protoplastos viables (Andreu y col., 2008); así, una herida en la planta puede alterar la fisiología de la misma durante horas o días (Potrykus y Shillito, 1986).

La luz es otro factor clave (Andreu y col., 2008); protoplastos aislados de plantas crecidas bajo alta irradiancia, suelen ser especialmente sensibles y si sobreviven, proliferan pobremente. La temperatura, la humedad relativa, y el fotoperiodo también afectan al estado fisiológico de la planta, y por lo tanto al éxito en la obtención de los protoplastos. Por otra parte, entre los factores que más influyen sobre la capacidad de los protoplastos y de las células derivadas de los mismos para expresar su totipotencia y producir plantas fértiles, están la fuente de material, el medio de cultivo y los factores ambientales (Davey y col., 2005).

La fuente de material más utilizada en la obtención de protoplastos está constituida por células de mesófilo de hojas jóvenes, procedentes de brotes obtenidos *in vitro*. Otras veces, se han usado suspensiones celulares, en cereales y en tomate, o incluso, cultivos embriogénicos en cítricos (Bhojwani y Dantu, 2013). Se requieren al menos dos enzimas, una pectinasa que separe las células entre si al disolver la lámina media, y una celulasa, para degradar la pared celular; las combinaciones, concentraciones y tiempos de actuación se tendrán que ajustar en cada caso (Sun y col., 2013). La

plasmólisis antes de la digestión enzimática del material en una solución de azúcar alcohol, reduce los daños citoplasmáticos y la fusión espontánea de protoplastos entre células adyacentes, tal y como señalan Ortín Párraga y Burgos (2003) en melocotón. Tras la digestión enzimática, se requiere purificar los protoplastos viables obtenidos separándolos de los restos de solución enzimática, tejidos, células y protoplastos inviables. Para ello, se han de extremar los cuidados en los lavados, realizando las centrifugaciones a la menor velocidad permitida para su recuperación, así como filtraciones con un tamaño de poro adaptadas a cada material, ya que la principal característica de los protoplastos es su fragilidad (Warren, 1991).

En 24 horas los protoplastos deben sintetizar la pared celular, aunque en cereales y leñosas el proceso suele ser más lento (Bhojwani y Dantu, 2013), pero si la formación de la pared celular no es correcta o es demasiado fina, aunque ocurran las divisiones nucleares puede que no se de la citocinesis. La división celular se ve afectada por varios factores, entre ellos, el genotipo, la fuente de material, el método de aislamiento, la viabilidad de los protoplastos, la composición del medio y las condiciones de cultivo. Los protoplastos necesitan una protección osmótica adecuada hasta que sus nuevas paredes primarias sean capaces de contrarrestar la presión de turgencia ejercida por el citoplasma. En ocasiones, una reducción progresiva de la presión osmótica mediante diluciones del medio de cultivo, es crítica para mantener las divisiones mitóticas que permitan formar células hijas (Davey y col., 2005).

La densidad de cultivo es importante, y aunque habrá que determinarla en cada caso, normalmente el óptimo se sitúa entre 5×10^4 – 1×10^5 protoplastos. ml^{-1} ; en ajo, Metwally y col. (2014), optimizando el protocolo de aislamiento y fusión de protoplastos en dos cultivares de interés, utilizaron una densidad de cultivo de 1×10^5 protoplastos. ml^{-1} . Los requerimientos nutricionales

de los protoplastos varían entre especies y a veces, incluso entre tejidos de la misma especie (Davey y col., 2005). Generalmente, para el cultivo, los medios se han basado en las formulaciones MS (Murashige y Skoog, 1962) y B5 (Gamborg y col., 1968), además de un osmótico y un azúcar alcohol. A veces, se ha empleado el medio 8p (Kao y Michayluk, 1975), más complejo, conteniendo leche de coco, que ha permitido el cultivo de protoplastos de numerosas especies. Respecto a los reguladores de crecimiento, normalmente se necesitan auxinas y citoquininas (Davey y col., 2005). Se ha visto en varias especies que el tidiazuron estimula la inducción de brotes, no sólo por su actividad como citoquinina, sino también por su efecto modulador de los niveles endógenos de auxinas (Murthy y col., 1996; Quesada y col., 2007); así, Nyman y Wallin (1992a) en fresa, observaron que el porcentaje de tallos obtenidos a partir de callo aumentó desde un 54% hasta un 88% al reemplazar BA por TDZ (Nyman y Wallin, 1992a). Como fuente de carbono, se suele utilizar sacarosa y glucosa (Davey y col., 2005).

Los protoplastos son muy sensibles a la luz, de modo que se suelen incubar en obscuridad, o a baja intensidad lumínica, hasta que hayan regenerado la pared celular y hayan ocurrido las primeras divisiones, incubándose normalmente a 25-30°C. La regeneración posterior tendrá lugar vía organogénesis o embriogénesis somática, aunque es más frecuente la ocurrencia de organogénesis (Xu y Xue, 1999).

Durante el proceso de obtención, cultivo y regeneración de plantas a partir de protoplastos, puede aparecer variación somaclonal, también denominada variación protoclonal (Davey y col., 2005). Los protoplastos incluyen regeneración a través de una fase de crecimiento desorganizado de callo (Karp, 1994), pudiendo ocurrir durante los procesos de dediferenciación y rediferenciación, cambios cualitativos y cuantitativos en el genoma de las plantas (Bairu, 2011).

En el presente trabajo se pretende desarrollar un protocolo eficiente de obtención de protoplastos, cultivo y regeneración de plantas de fresa, cultivar Chandler, así como estudiar el comportamiento agronómico del material obtenido, para evaluar la posible ocurrencia de variación somaclonal.

V.2. Materiales y Métodos

Para el aislamiento y regeneración de plantas de fresa a partir de protoplastos se siguió el procedimiento descrito por Nyman y Wallin (1988, 1992a) utilizado con éxito en los cvs. Sengana y Canoga, así como en la línea de mejora 77101. En la Figura 1 se muestra un esquema de este protocolo.

Las principales fases del proceso son el pretratamiento del material de partida, la digestión de los brotes con enzimas celulasas y pectinasas para eliminar la pared celular, el aislamiento y purificación de los protoplastos cultivándolos después en agarosa para formar microcallos, y la regeneración de plantas a partir de esos microcallos. Cada una de estas fases, así como los experimentos realizados para optimizar el proceso en el cv. Chandler, se detallan a continuación.

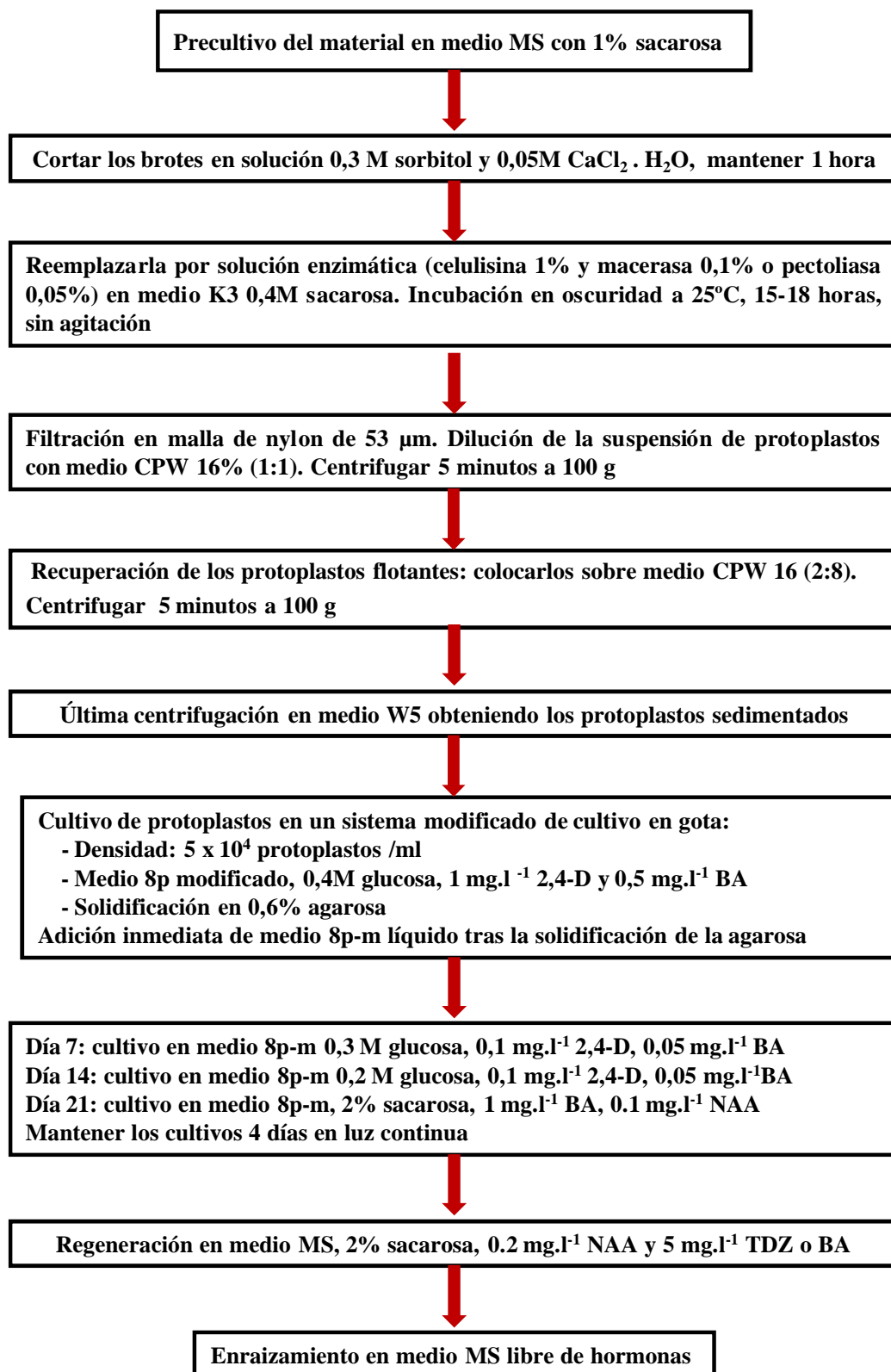


Figura 1. Esquema del protocolo empleado por Nyman y Wallin (1988, 1992) para el aislamiento y cultivo de protoplastos, así como obtención de plantas regeneradas en fresa, cvs. Sengana y Canoga y en la línea de mejora 77101.

V.2.1 Fuente de material vegetal

Como fuente de material, se usaron plantas micropropagadas del cultivar Chandler. El material había sido establecido a partir de ápices meristemáticos de 3 mm de longitud, y subcultivado a intervalos de 4 semanas en un medio que contenía los macroelementos $N_{30}K$ (Margara, 1984), micronutrientes y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), 20 g.l⁻¹ de sacarosa y 0,47 mg.l⁻¹ Kinetina (Figura 2).



Figura 2. Stock de plantas *in vitro* de fresa, cv. Chandler, mantenidas en medio estándar de multiplicación conteniendo kinetina.

Transcurridos diez meses, las plantas fueron transferidas a medio MS suplementado con 1% de sacarosa, 2 mg.l⁻¹ de BA y 0,3% gelrite durante 3-4 subcultivos de 3 semanas, para inducirles un estado hiperhídrico, siguiendo las recomendaciones de Nyman y Wallin (1988). Inicialmente, se evaluó el efecto de la duración del último subcultivo en el medio inductor de hiperhidricidad (3, 4 ó 5 semanas) sobre la viabilidad de los protoplastos obtenidos. Las plantas utilizadas como fuente de protoplastos eran brotes

jóvenes que se mantenían bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz ($50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

V.2.2 Aislamiento y purificación de los protoplastos

Los brotes de fresa en estado hiperhídrico fueron finamente troceados en una solución de preplasmólisis con medio W_5 (Menzel y col., 1981) conteniendo 0,3 M sorbitol y 0,05 M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlberg y col., 1983), en condiciones de oscuridad durante 30–60 minutos. Transcurrido este tiempo, el medio W_5 se sustituyó por una solución enzimática estéril conteniendo medio nutritivo K_3 (Menzel y col., 1981), una combinación de enzimas que degradan la pared celular (1% celulicina y 0.1% macerasa) y sacarosa 0,4 M (Nyman y Wallin, 1988). El material se incubó en oscuridad a 25°C y agitación lenta (20 rpm) durante 18 horas. Un poco antes de que finalizara la incubación, se agitó suavemente la mezcla para ayudar a liberar los protoplastos.

La purificación estándar se llevó a cabo realizando una primera separación entre protoplastos liberados y material no digerido, mediante filtración a través de una malla de nylon de $53 \mu\text{m}$ de diámetro; para ello, se diluyó la solución enzimática conteniendo los protoplastos, a partes iguales, con medio CPW 16 ((sales CPW, y 16% sacarosa (p/v)) (Banks y Evans, 1976), tal y como indicaban Nyman y Wallin (1988), centrifugándose durante 5 minutos a 50g. A continuación, se retiró cuidadosamente la banda superior obtenida conteniendo los protoplastos flotantes y se colocó esta vez sobre medio nuevo CPW 16 en una proporción (2:8), centrifugándose una segunda vez en las mismas condiciones anteriores. Posteriormente, se mezclaron 1,5–2 ml de la banda superior de protoplastos flotantes con 8,5–8 ml de medio W_5 , para obtener, tras una nueva centrifugación, la sedimentación de los

protoplastos. En esta fase del aislamiento se estimó tanto la supervivencia como la cosecha de protoplastos obtenida, usando como indicador la regeneración de la pared celular, y ayudándonos de un hemocitómetro de Rosenthal para realizar el conteo. La viabilidad se expresó como porcentaje de protoplastos vivos obtenidos sobre el total, realizándose finalmente un último lavado en medio W_5 .

V.2.2.1 Influencia de la concentración de sacarosa y el percoll en la recuperación de protoplastos viables

Para mejorar la recuperación de protoplastos viables, se estudió el efecto del incremento de la concentración de sacarosa del medio de lavado CPW desde el 16 al 21%, así como su sustitución durante el segundo lavado por una solución de percoll y sacarosa 0,8 M (1:1).

V.2.3 Cultivo y regeneración de plantas

Los protoplastos se cultivaron en medio nutritivo líquido 8p modificado (Glimelius y col., 1986), suplementado con 0,4 M glucosa, 1 mg.l⁻¹ ANA y 0,5 mg.l⁻¹ BA ó 0,25 mg.l⁻¹ TDZ. Para ello, se mantenían creciendo en un sistema de cultivo en gota modificado (Shillito y col., 1983), de modo que el mismo día o un día después del aislamiento, se añadía 0,6% agarosa como agente solidificante, quedando de este modo los protoplastos separados, embebidos en un medio semisólido. Posteriormente, se iniciaba el cultivo separando porciones del medio conteniendo los protoplastos, como si de una tarta se tratara, y en una placa Petri, se añadían 3 ml de medio líquido fresco 8p modificado, para promover el crecimiento de los protoplastos y la formación de los microcallos. La osmolaridad se reduciría progresivamente mediante cambios semanales a medio nuevo, disminuyendo la concentración de glucosa de 0,4 a 0,2 M. Transcurridas unas 3-4 semanas desde el inicio, se añadía

medio líquido 8p modificado conteniendo 2% sacarosa, $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ANA y 1 mg.l^{-1} BA, durante 1 ó 2 semanas, hasta la obtención de microcallos visibles a simple vista; entonces, segmentos del medio con agarosa conteniendo los microcallos, se colocarían sobre el mismo medio 8p modificado descrito anteriormente, pero esta vez solidificado con agarosa hasta obtener, generalmente a las 4 semanas, callos de unos 2-3 mm de diámetro. Los microcallos así obtenidos se pasaban posteriormente a medio sólido de regeneración.

V.2.3.1 Influencia de la duración del cultivo en agarosa antes de la adición de medio líquido.

En un primer experimento, se estudió la influencia de la duración del tiempo de cultivo en agarosa (de 1 a 5 días) antes de la adición de medio líquido 8p modificado sobre la supervivencia de los protoplastos obtenidos.

V.2.3.2 Efecto de diferentes densidades de cultivo en medio con BA ó TDZ

Se realizó un experimento para comprobar la influencia que tenía el cultivo a diferentes densidades (10^4 , $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 , 10^5 , 2×10^5 protoplastos. ml^{-1}), así como la citoquinina BA o TDZ presente en el medio 8p de formación de microcallos, sobre la inducción de divisiones en los protoplastos obtenidos.

La frecuencia de las divisiones se estimó a partir de la primera semana del aislamiento, mediante el conteo de protoplastos que habían formado grupos celulares.

V.2.3.3 Efecto del medio de cultivo en la regeneración de plantas

Los microcallos obtenidos en el medio 8p sólido suplementado con 2% sacarosa, $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ANA y 1 mg.l^{-1} BA fueron transferidos a tres medios de

regeneración diferentes: MS conteniendo $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ANA y 5 mg.l^{-1} BA ó 3 mg.l^{-1} TDZ, suplementados en ambos casos con 2% de sacarosa y 0,3% agarosa, y medio MS modificado con los macroelementos N_{30}K (Margara, 1984) al que se le añadían $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA, 2 mg.l^{-1} BA y agar como agente solidificante (6 g.l^{-1}) (Barceló y col., 1998).

Finalmente, las plantas obtenidas se multiplicaban en el medio desarrollado por López Aranda y col. (1994), donde la citoquinina BA se sustituyó por $0,47 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetina, estableciéndose así los nuevos protoclonos.

V.2.4 Aclimatación

Las plantas obtenidas de este modo, 26 protoclonos junto a un control micropropagado, se llevaron a invernadero para proceder a su aclimatación (Figura 3). Para ello, el material se mantuvo inicialmente durante 2-3 semanas en túnel de aclimatación (Figura 3A), colocado en bandejas de corcho blanco (Figura 3B) conteniendo una mezcla (1:1) de substrato 1 y perlita. Transcurrido este periodo, las plantas se traspasaron a alveólos negros con substrato1:perlita:arena de río (70:10:20) colocándose en túnel descubierto (Figura 3C,D). La temperatura y humedad se redujeron de manera progresiva durante el proceso de endurecimiento.



Figura 3. Aclimatación de plantas de fresa, cv. Chandler, obtenidas a partir de protoplastos. A: túnel de aclimatación, con humedad y temperatura controladas. B: protoclonos aclimatándose en bandejas de corcho. C: protoclonos aclimatados en túnel descubierto. D: detalle de protoclonos en alveólos negros.

Cuando el material alcanzó el tamaño adecuado, se transplantaron a macetas de 9 cm (Figura 4A) y posteriormente de 25 cm (Figura 4B), que se mantendrían en umbráculo para su endurecimiento, hasta su posterior implantación en campo.

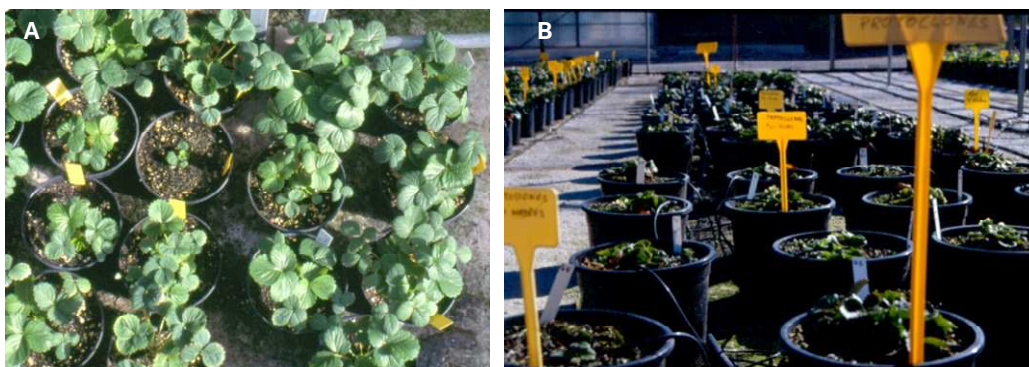


Figura 4. Protoclones aclimatados, transplantados a macetas y mantenidos en umbráculo para su endurecimiento, antes de su implantación. A: plantas en macetas de 9 cm de diámetro. B: plantas en umbráculo en macetas de 25 cm de diámetro.

V.2.5 Comportamiento de los protoclones en vivero

Las plantas madres se establecieron en un vivero del IFAPA Centro de Málaga (Figura 5), durante seis meses, con objeto de evaluar la capacidad de estolonado y obtener una generación hija (F1) para su establecimiento posterior en campo de fructificación. Los 26 protoclones, con tres repeticiones cada uno, y un control micropropagado, se plantaron sobre lomos en 4 líneas distribuidas en un campo con una superficie de 400 m²; el marco de plantación empleado fue de 2 m entre caballones y 1,85 m entre plantas. Se aplicó periódicamente abono y sequestrene incorporados al agua en un sistema de riego por goteo. El terreno, típico de la Vega Baja del Guadalhorce, era franco-arcilloso de pH alcalino (>8).



Figura 5. Plantas madres de fresa, cultivar Chandler, obtenidas a partir de protoplastos mediante organogénesis adventicia y establecidas en vivero (IFAPA, Centro de Málaga).

A los dos meses de su implantación en suelo, evaluación en vivero 1, se contabilizó el número de ramilletes florales presentes en cada planta. Posteriormente, transcurridos tres meses de permanencia en la parcela, evaluación en vivero 2, se tomaron datos del aspecto de las plantas (evaluado como planta madre verde, ligeramente clorótica y clorótica), número de estolones de primer orden y vigor. El vigor se estimó asociando la parte aérea de la planta a una elipse, de la cual se tomaron la longitud de los dos ejes, calculando el área de acuerdo a la fórmula: $A = (a \times b / 4) \pi$. En octubre, evaluación en vivero 3, tras seis meses, las plantas presentaban un porte más desarrollado, y además del número de estolones de primer orden, se contabilizó el número de folíolos por hoja, en una muestra de 10 hojas por planta, anotándose la aparición de anomalías. También se cuantificó el

número de plantas hijas por planta madre, así como el aspecto de las mismas.

V.2.6. Comportamiento de los protoclonos en campo de fructificación

Una vez obtenida la población hija (F1), las plantas se llevaron a la finca experimental “El Cebollar” (IFAPA, Centro de Huelva), para su evaluación agronómica bajo cubierta en macrotúnel (Figura 6).



Figura 6. Protocolones de fresa, cv. Chandler, establecidos en una finca experimental del IFAPA de Huelva. A: vista del protoclon 14 sobre lomo de arena con cubierta de plástico negro. B: detalle de protoclon 22.

En octubre, se plantaron 22 protoclonos diferentes, ya que 4 murieron en el primer ensayo de evaluación, junto a un control micropropagado y otro macropropagado. Los protoclonos colocados sobre lomos cubiertos con plástico negro, con tres repeticiones cada uno, se establecieron en tres bloques diferentes, que a su vez constaban de subparcelas de 10 plantas cada una (30 plantas por protoclon). El tipo de cobertura empleado fue macrotúnel de plástico térmico 600 G.

Se tomaron datos morfológicos después de siete meses de su establecimiento en campo, anotándose el vigor o masa foliar de la parte aérea de las plantas; el largo y ancho de la parte aérea en cm; el crecimiento, evaluado como erecto (3), normal (5) o rastrero (7); el número de folíolos en hoja; la frondosidad, medida como baja (3), media (5) y alta (7); así como el color de la hoja, catalogado como clorótico (1), verde claro (3), verde (5) y verde oscuro (7).

Los datos de fructificación se obtuvieron a lo largo de 16 recolecciones realizadas cada 4 ó 5 días en una campaña, pesándose los frutos. La primera evaluación se llevó a cabo cuando se observó una producción cuantificable, anotándose el peso y el número de frutos por planta. En el mes anterior a esta primera recolección, se eliminaron los frutos que aparecían en algunas plantas, y no fueron contabilizados en la producción final. Además se estudiaron los siguientes caracteres morfológicos de los frutos: cavidad interna, medida como ausente (3), media (5) o grande (7); color externo, evaluado con colorímetro, y color interno anotado como blanquecino (1), rojo claro (3), rojo medio (5), rojo oscuro (7); forma más frecuente, pudiendo ser aplanada o reniforme (1), globosa (2), acorazonada (3), cónica (4), cónica alargada (5), bicónica (6), cuneiforme larga (7), cuneiforme corta (8), siguiendo el código del CIREF (Figura 7), más tres nuevas formas introducidas en este trabajo en base a los resultados obtenidos: dediforme o multilobular (9), ventosa (10), y campaniforme (11) (Figura 8); y por último, se estimó la dureza media. Para evaluar la firmeza de los frutos maduros se utilizó un penetrómetro con aguja de 3,5 mm de diámetro. Se realizaron 5 pinchazos por fruto maduro, en una muestra de tres frutos por protocolo y recolección.

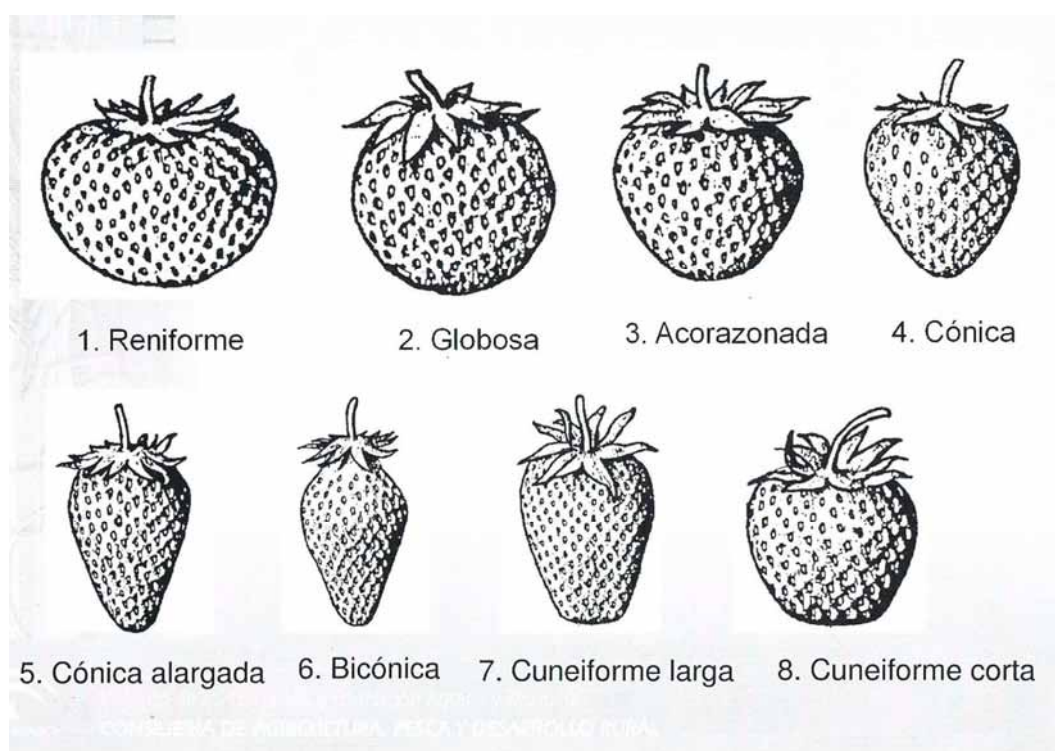


Figura 7. Morfología del fruto de fresa (Código CIREF: Centre Interrégional de Recherche et d'Expérimentation de la Fraise)

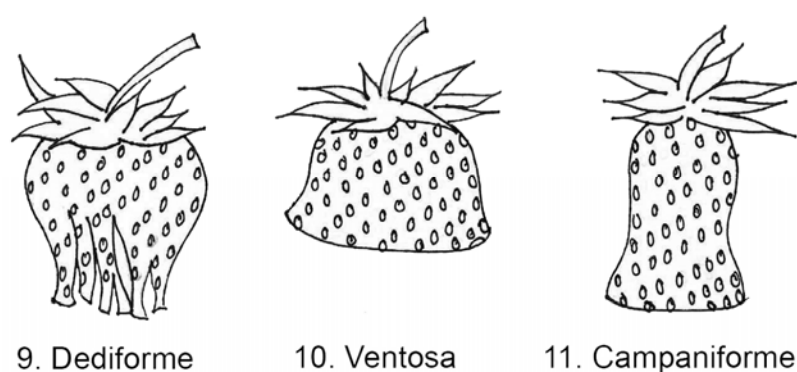


Figura 8. Otras formas de fruto frecuentes obtenidas en protoclonos de fresa. Dediforme o multilobular (9). Ventosa (10). Campaniforme (11).

V.2.7 Estabilidad genética de los protoclonos

La estabilidad genética del material se evaluó estudiando el contenido de ADN en algunos protoclonos, con respecto al control Chandler octoploide, a través de citometría de flujo.

El análisis de ploidía se realizó en la primera generación de protoclonos (F1), utilizando un equipo (Partec, Munster, Germany) con una lámpara HBO de mercurio de 100W y filtros kG1 y BG38. Se tomaron secciones de hoja de 1x1 cm aproximadamente procedentes del control Chandler y de cada uno de los protoclonos evaluados, que fueron troceadas finamente en 1 ml de una solución de extracción de ADN nuclear (kit de alta resolución de ADN, tipo P, solución B, Partec). Las medidas en el citómetro de flujo se realizaron con un mínimo de 1,000 núcleos por muestra. La intensidad de fluorescencia del histograma obtenido se analizó con el programa DPAC v 2.0 (Partec) incorporado al citómetro. En cada análisis, este programa determina las posiciones de los picos máximos, el coeficiente de variación y la ploidía relativa de las muestras.

Adicionalmente, se realizó un estudio con diez marcadores EST-SSR (Gil Ariza y col., 2009) en algunos protoclonos seleccionados con diferente productividad, clones 2, 3, 4, 8, 9, 11, 18, 20, 21, 26, y el control (Tabla 1). Para ello, se amplificó mediante PCR el ADN extraído de las muestras en un termociclador Icyler (BioRad Laboratorios, Hercules, CA). Los fragmentos de PCR se separaban en geles de poliacrilamida para realizar el análisis de polimorfismos en un secuenciador Sequi-Gen GT (BioRad, Munich). A partir de los valores de similitud, basados en estos marcadores, se generó un dendograma usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average), para determinar las relaciones entre los protoclonos analizados.

Tabla 1. Descripción de los marcadores microsatélites ChFaM (Gil Ariza y col., 2009)

Locus	Secuencia Primer (5'-3')	Nº accesión Banco Génico
ChFaM1	F:GGAGATTATGCACAAAATATAGAGA R:CCAGAACTCCATCAGCCTCT	DY633373
ChFaM2	F:CGCAAACCCAATCTCCT R:ATTGGGAATGTGAAAACG	DY633374
ChFaM4	F:CCCAGCATATACTTTGCCGTA R:TCCTTTCTTCATCCCCTCCT	DY633375
ChFaM5	F:ATCGCGTTCATTCTTTGA R:GACCCATATAGTCTCCAATAAAAGC	DY633376
ChFaM7	F:AATATATTACTCATCCAATCTTGTC R:AGATGGAGGGCTTGGAAGTT	DY633377
ChFaM8	F:TTCTCCCTCACAAACCCAAT R:TCCTTCTCTGTGCCGAAGAT	DY633378
ChFaM14	F:GGGAGGTTCTGCTTTTAGGG R:GGTCACCTGCCTGTTGATCT	DY633379
ChFaM21	F:CACCTGTTGCAGTTGTGTGA R:GAATGAAAATACTTGTTTTGAGATCG	DY633380
ChFaM23	F:AGGAGAAGACCGGCTGTGTA R:TGCCTATAGCTGTGGCTGTG	DY633381
ChFaM29	F:ACTTCATCGCCAGAATGGTC R:GCCATTCAATACACAATCCAA	DY633382

V.3. Resultados

V.3.1 Fuente de material

La manipulación de las plantas antes del aislamiento de los protoplastos afecta al éxito en la respuesta obtenida, probablemente porque se modifique el estado fisiológico del material. En este caso, las plantas se transfirieron a un medio suplementado con baja sacarosa y mayor cantidad de

citoquinina, concretamente BA, al objeto de inducir en el material un desarrollo de colonias más pequeñas, hojas plegadas, peciolo cortos y aspecto en general, achaparrado e hiperhídrico (Figura 9).

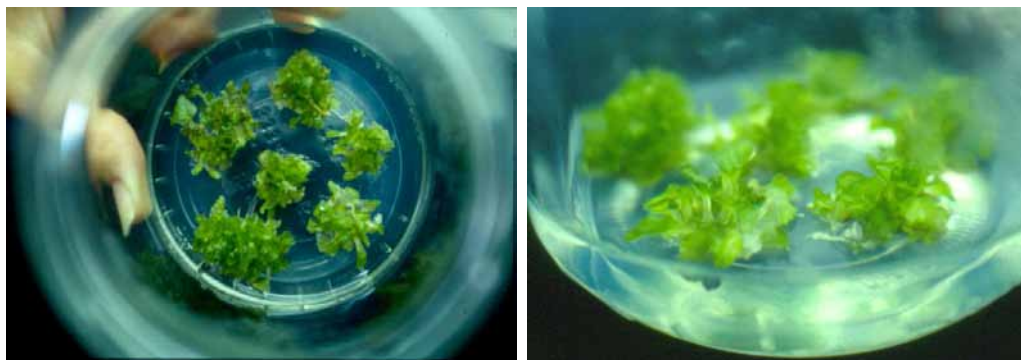


Figura 9. Plantas hiperhídricas de fresa, cultivar Chandler, mantenidas en medio de multiplicación conteniendo 2 mg.l^{-1} BA, antes del aislamiento de los protoplastos.

V.3.1.1 Efecto de la duración del último subcultivo en el medio para inducir hiperhidricidad

Al evaluar el efecto de la duración del último subcultivo (3, 4 ó 5 semanas) en el medio inductor de hiperhidricidad, se observó que el material cultivado durante tres semanas aún no había empezado a ennegrecerse, no observándose exudados en el medio. Un aumento del periodo de cultivo provocaba un deterioro en la calidad del material que empezaba a tomar color marrón, especialmente en el callo de la base, lo cual tenía un efecto claramente negativo sobre el proceso de aislamiento y la calidad de los protoplastos obtenidos.

En la Figura 10 se observa como el incremento en el número de semanas en este medio de 3 a 5, hace que el porcentaje de protoplastos viables disminuya desde un 86% hasta un 70%.

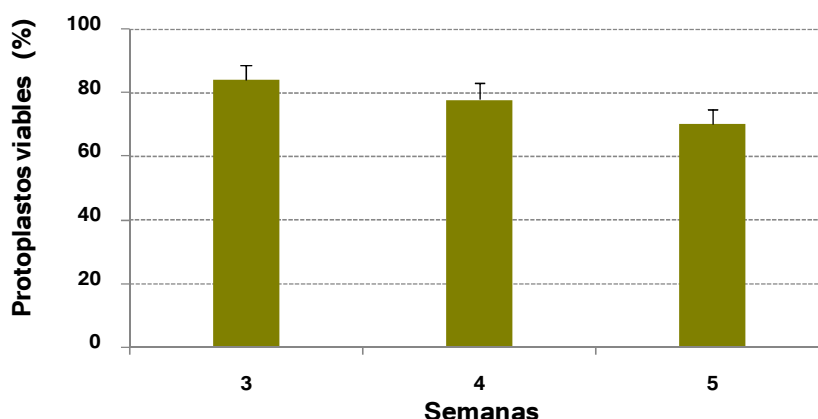


Figura 10. Efecto de la duración del último subcultivo en el medio de inducción de hiperhidricidad (MS suplementado con 2 mg.l^{-1} BA, 1% de sacarosa y 0,3% de gelrite), sobre la supervivencia de protoplastos de fresa, cultivar Chandler.

V.3.2 Aislamiento y purificación de los protoplastos

V.3.2.1 Influencia de la concentración de sacarosa y el percoll en la recuperación de protoplastos viables

En este experimento se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa en el medio de lavado de los protoplastos, así como su sustitución por percoll, sobre la eficiencia en la recuperación de protoplastos viables. En la Figura 11, se aprecia como el incremento de la proporción de sacarosa en el medio de lavado CPW desde un 16% hasta un 21%, incrementó considerablemente el porcentaje de protoplastos vivos de Chandler desde un 64% a un 77%. Este valor aumentó un 10% adicional, alcanzando valores cercanos al 90% de supervivencia, con la sustitución de la sacarosa al 21% en el segundo lavado con medio CPW, por una solución 1:1 de percoll y sacarosa 0,8 M (Figura 11).

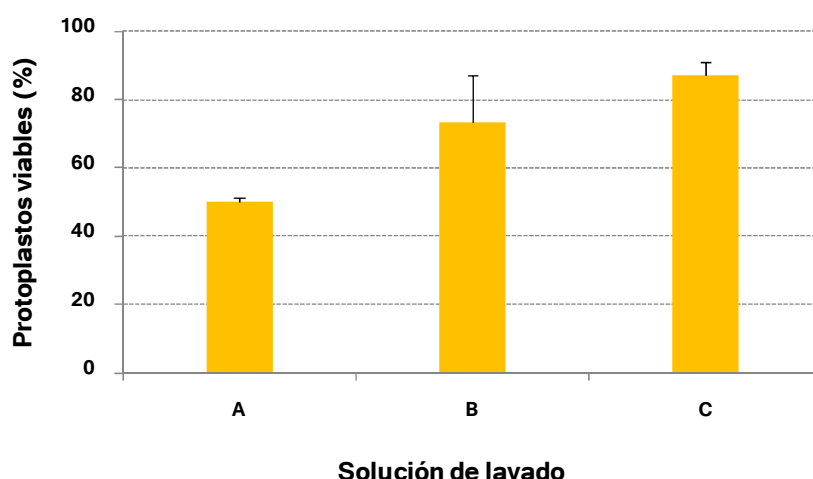


Figura 11: Efecto de la solución de lavado sobre la supervivencia de protoplastos de fresa. A: 2 lavados en CPW con sacarosa 16%; B: 2 lavados en CPW con sacarosa 21%; C: 1 lavado en CPW con sacarosa 21% seguido de 1 lavado en una solución 1:1 de percoll y sacarosa 0,8 M.

La utilización del gradiente de densidad mediante el uso de la solución de percoll y sacarosa permitió el aislamiento de protoplastos de diferentes tamaños. En la Figura 12 se puede observar el aspecto de los protoplastos obtenidos tras los lavados y purificación con el protocolo optimizado.

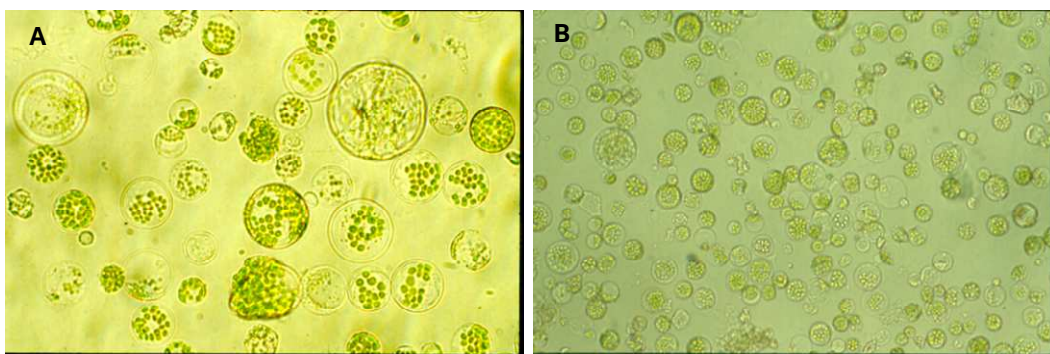


Figura 12. Protoplastos aislados a partir de plantas de fresa *in vitro*, cv. Chandler. A: protoplastos con presencia de cloroplastos. B: protoplastos de diferente densidad y tamaño.

En general, el tamaño y densidad de los protoplastos obtenidos en Chandler era variable, apareciendo dos poblaciones celulares, una de protoplastos grandes conteniendo numerosos cloroplastos verdes, y otros de menor tamaño, con menos cloroplastos o vacuolados.

V.3.3 Cultivo y regeneración de plantas

V.3.3.1 Influencia de la duración del cultivo en agarosa antes de la adición de medio líquido

Al variar la duración del periodo de cultivo en agarosa de 1 a 5 días antes de la adición del medio líquido, se observó que los mejores resultados de supervivencia se obtenían con un periodo de incubación de 2 a 4 días, obteniéndose el máximo de supervivencia, 87%, a los 3 días de cultivo (Figura 13). La regeneración de la pared celular era visible un día después del aislamiento.

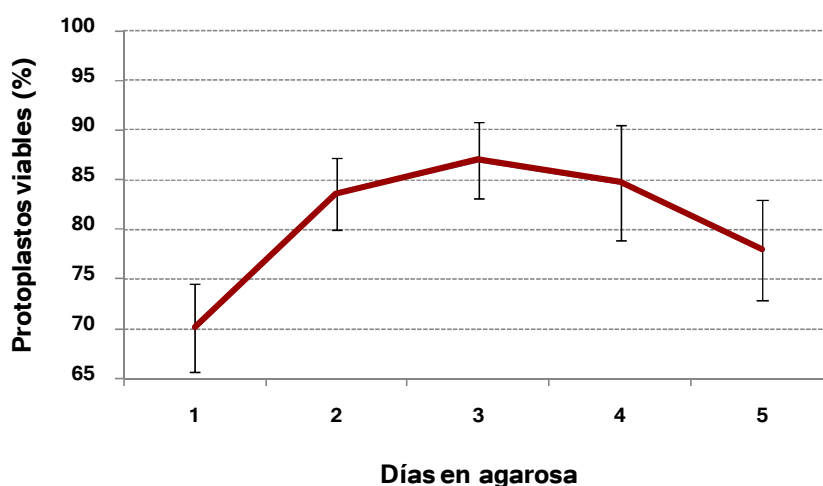


Figura 13. Efecto del tiempo de permanencia en agarosa, antes de la adición de medio líquido 8p-m, sobre la supervivencia de protoplastos de fresa, cv. Chandler.

V.3.3.2 Efecto de diferentes densidades de cultivo en medio con BA y TDZ

En este experimento se estudió el efecto de la densidad de protoplastos, cultivados en medio 8p suplementado con BA o TDZ, en la proliferación de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la densidad de inóculo y del medio de cultivo en la inducción de divisiones celulares en protoplastos de fresa, cv. Chandler, obtenidos a partir de plantas mantenidas *in vitro*. Datos tomados a las dos semanas. Frecuencia de proliferación celular: (-) ausencia de divisiones, (+) baja, (++) intermedia, (+++) alta.

Densidad de cultivo (protoplastos.ml ⁻¹)	8p-m, 1 mg.l ⁻¹ ANA, 0,5 mg.l ⁻¹ BA	8p-m, 1 mg.l ⁻¹ ANA, 0,25 mg.l ⁻¹ TDZ
1 x 10 ⁴	-	-
2,5 x 10 ⁴	-	-
5 x 10 ⁴	++	++
1 x 10 ⁵	++	++
2 x 10 ⁵	++	+++

A las dos semanas de cultivo, los mejores resultados se obtuvieron con densidades medias-altas (5×10^4 , 1×10^5 y 2×10^5 prot.ml⁻¹), produciéndose un rápido crecimiento celular en la densidad más alta, 2×10^5 prot.ml⁻¹ (Figura 14). Cuando se cultivaba a bajas densidades, no se observaron divisiones. Además, con una densidad de población de 1×10^4 prot.ml⁻¹, apenas si se obtenían protoplastos vivos. En cuanto al medio de cultivo, se obtuvieron mayores tasas de división celular en el medio suplementado con TDZ (Tabla 2).

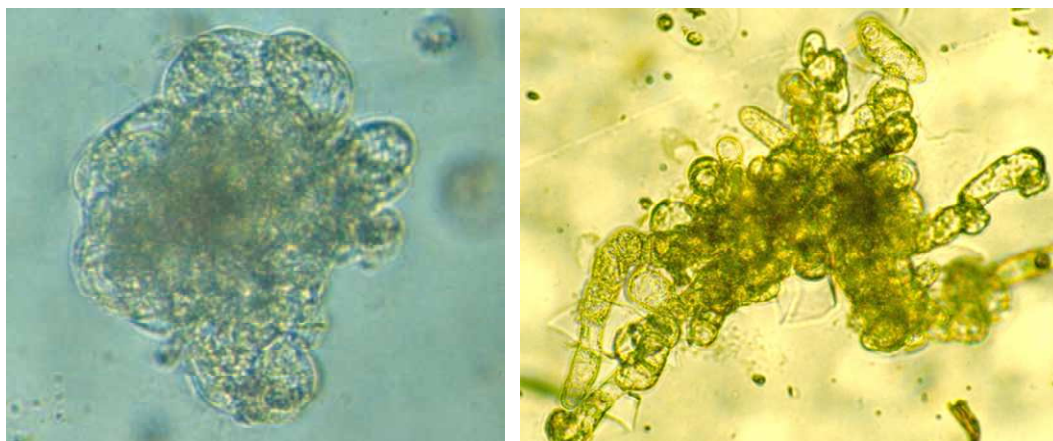


Figura 14. Colonias celulares en crecimiento, procedentes de protoplastos de fresa, cv. Chandler, aislados de plantas cultivadas *in vitro*. Medio de cultivo 8p-m, conteniendo ANA y TDZ.

V.3.3.3 Efecto del medio de cultivo en la regeneración de plantas

Los microcallos obtenidos se cultivaron en medio MS suplementado con ANA 0,2 mg.l⁻¹ y las citoquininas BA a 5 mg.l⁻¹ ó TDZ a 3 mg.l⁻¹ para evaluar la obtención de brotes adventicios. Además, se testó el medio N₃₀K suplementado con AIB 0,5 mg.l⁻¹ y BA 2 mg.l⁻¹, ya que este medio se había utilizado para la regeneración de brotes a partir de discos de hoja del cv. Chandler.

Se obtuvo regeneración en todos los medios de cultivo a partir de las 8 semanas (Figuras 15). El medio más favorable para la regeneración de brotes fue el que incluía una elevada concentración de la citoquinina BA (5 mg.l⁻¹) (MS-BA), obteniéndose a las 16 semanas un 24% de regeneración (Figura 15); seguido por el medio suplementado con TDZ (MS-TDZ), no encontrándose diferencias significativas entre ambos. Por el contrario, las menores tasas de regeneración se obtuvieron en el medio N₃₀K-BA.

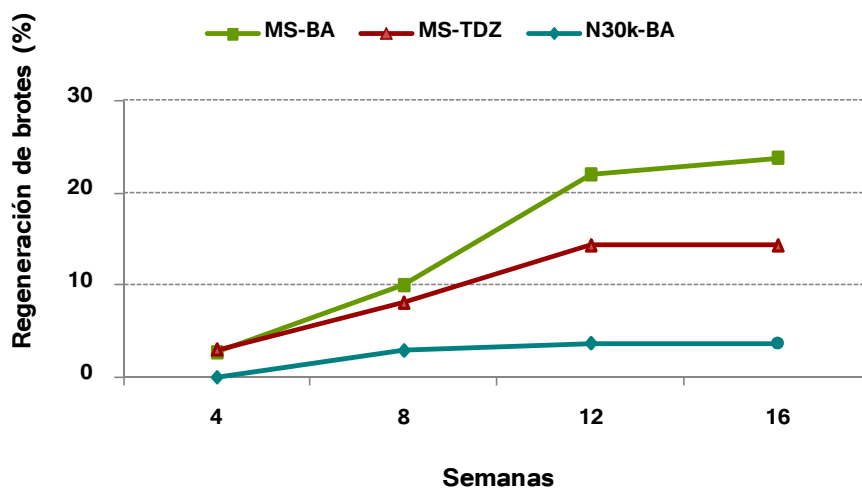


Figura 15. Efecto del medio de cultivo en el porcentaje de regeneración de brotes adventicios en callos derivados de protoplastos de fresa, cv. Chandler, obtenidos a partir de plantas mantenidas *in vitro*.

En la Figura 16 se observa el aspecto de algunos de los callos derivados de protoplastos en fase de regeneración.

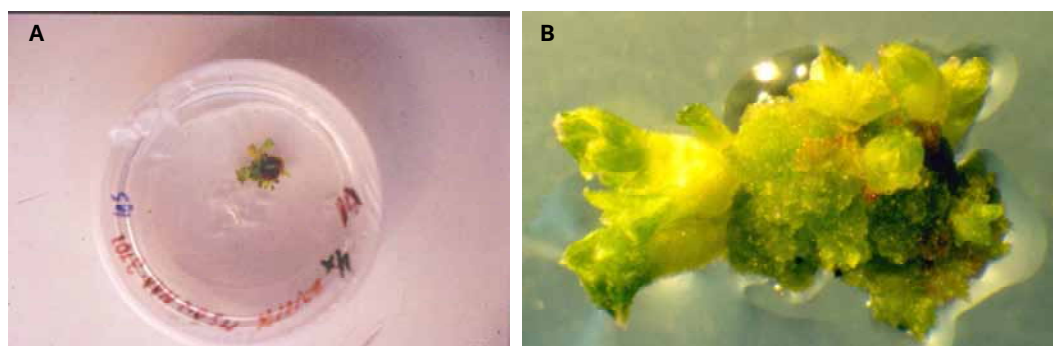


Figura 16. Brotes adventicios de fresa, cultivar Chandler, procedentes de microcallos crecidos a partir de protoplastos aislados. A: microcallo regenerante en medio de cultivo MS, 0,2 mg.l⁻¹ ANA, 3 mg.l⁻¹ TDZ. B: detalle de brote de fresa, obtenido a partir de un microcallo cultivado en medio MS, 0,2 mg.l⁻¹ ANA, 5 mg.l⁻¹ BA.

Transcurridas treinta semanas de cultivo, se obtuvieron un total de 26 protoclonos que fueron multiplicados *in vitro*. La Figura 17 muestra un esquema del protocolo de aislamiento y cultivo de protoplastos, así como, de la regeneración de plantas a partir de los mismos en el cv. Chandler, optimizado en este trabajo.

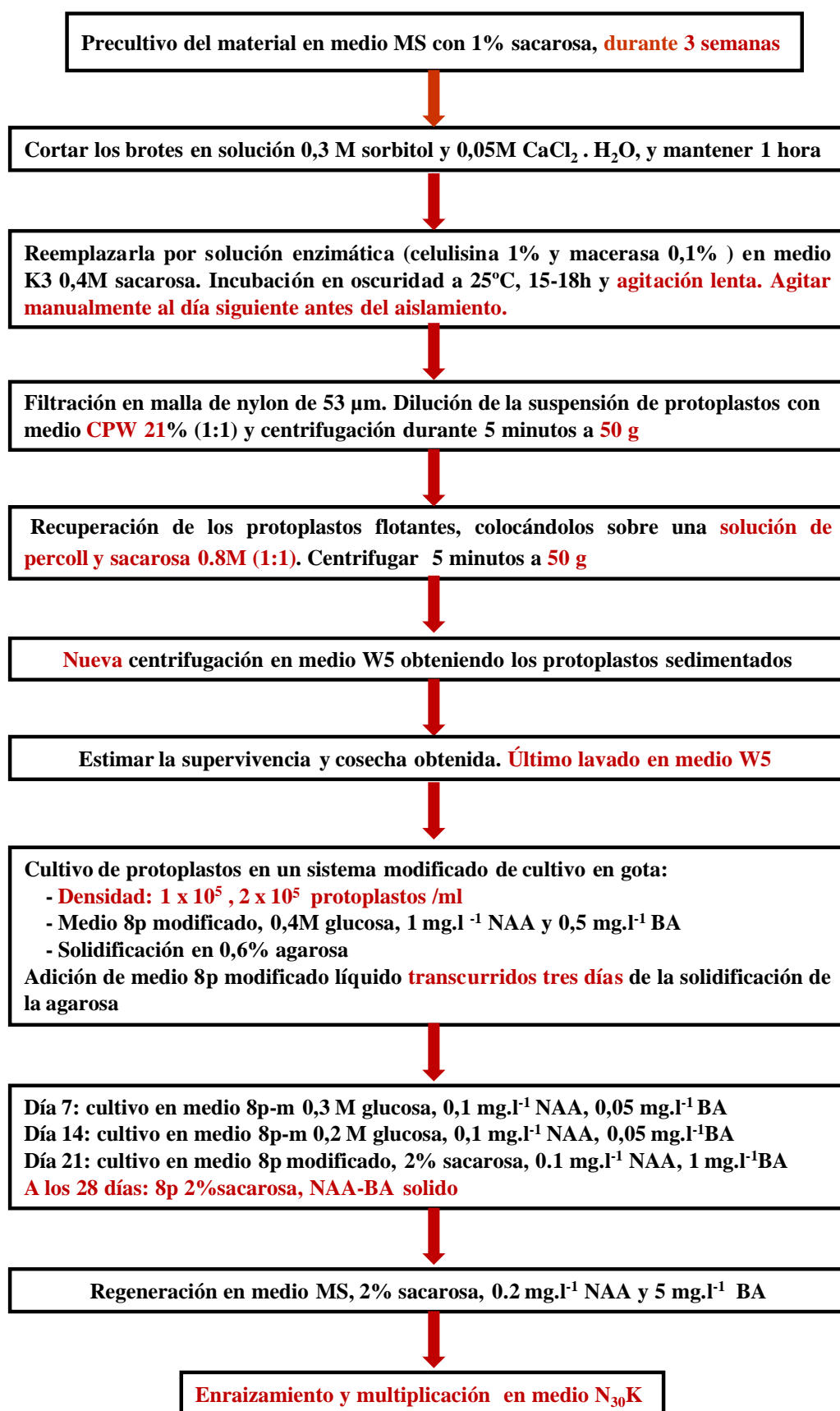


Figura 17. Esquema del protocolo de aislamiento y cultivo de protoplastos; así como de la obtención de protoclonos en el cv. Chandler, optimizado en este trabajo.

V.3.4 Aclimatación

Las plantas regeneradas, junto con un control micropropagado fueron aclimatadas con éxito, seleccionándose posteriormente tres individuos de cada línea (generación F0) que fueron cultivados en un vivero en el Centro IFAPA de Málaga con el fin de obtener un número suficiente de estolones (generación F1) para el ensayo de las líneas regeneradas en campo de fructificación.

V.3.5 Comportamiento de los protoclonos en vivero (F0)

La caracterización fenotípica de las plantas en vivero permitió observar variaciones tanto en la morfología de la planta como en el vigor. Algunas de ellas desaparecieron en la generación posterior, como fueron el escaso desarrollo vegetativo de algunas plantas o las variaciones en el color de hojas; otras, por el contrario, e.g. número de folíolos diferente a tres, se mantuvieron en las plantas hijas. La población madre presentaba importantes diferencias en el comportamiento de los clones en cuanto a superficie de la parte aérea, capacidad de estolonado y número de ramilletes florales. Se realizaron 3 evaluaciones morfológicas de las plantas madre, a los 2, 3 y 6 meses de su implantación en suelo.

Primera evaluación en vivero

En esta primera evaluación se cuantificó el número de ramilletes florales, encontrándose diferencias importantes entre protoclonos; así, por un lado, aparecían clones que no producían ningún ramillete floral (líneas 14, 24 y 25), o presentaban valores medios muy bajos, que fluctuaban en el rango 0,66-1,5 (clon 5, 17, 22 y 27), y por otro lado, clones que producían un gran número de ramilletes, en un rango de 7,33-9 (clones 1, 3, 6, 7, 8, 11); destacando el clon 21 ($16,3 \pm 2,02$). El control micropropagado producía una

media de 3 ramilletes florales por planta (3 ± 1), mientras que el valor medio de los ramilletes producidos por los protoclonos fue $4,6\pm0,2$.

Segunda evaluación en vivero

A los tres meses de la implantación en la parcela del vivero, durante el mes de julio, y aunque había ciertas diferencias entre los protoclonos, se observó que en general, las plantas presentaban un aspecto entre ligeramente clorótico y clorótico, incluido el material micropropagado. Los clones que tenían mejor aspecto desde el principio por presentar color verde fueron el 5 y el 24, seguidos por el 20, 17 y 14. Posteriormente, se observó una mejoría en las plantas tras tratar con un quelato corrector de clorosis (sequestrene), recuperando las plantas el color verde.

En relación al número medio de estolones de primer orden, también se encontraron diferencias significativas entre los distintos protoclonos; así, el valor medio más alto aparecía en el clon 21 con $29,7\pm2,7$ estolones por planta, seguido muy de cerca por el material micropropagado (23 ± 1). También destacaron por tener una alta capacidad de estolonado los clones 20 ($20,7\pm3,5$), 6 ($18,7\pm4,2$), 2 ($17,7\pm4,2$), 8 ($17\pm2,1$), 4 ($15,7\pm2,7$), 11 ($15,7\pm0,9$), 7 ($14,7\pm4,2$), 1 ($14\pm1,2$), 3 ($12,7\pm3,4$) y 22 ($11,7\pm2,2$). Por el contrario, hubo clones que ni siquiera llegaron a estolonar (5, 13, 17 y 27), a pesar de que dos de ellos, 5 y 17, presentaban color verde desde el principio. Finalmente, con una baja capacidad de estolonado estaban los clones 23, 12, 15, 14, 18, 24, 9, 10, 19 y 26, que tenían entre 1,3-6 estolones por planta.

En relación con la superficie foliar, también se observaron diferencias significativas entre los distintos protoclonos; el control micropropagado con una superficie de la parte área de $874,8\pm60,0\text{ cm}^2$ representa el máximo valor, seguido por los clones 20 ($777,7\pm99,3$), 2 ($679,1\pm67,5$), 21 ($637,9\pm92,7$) y 6 ($609,1\pm 28,8$), los clones que presentaban menor área

fueron el 5 ($118,0 \pm 47,1$), 18 ($119,5 \pm 3,2$), 14 ($122,3 \pm 40$), 13 ($139,9 \pm 9,6$), 24 ($156,7 \pm 29,9$), 23 ($181,9 \pm 20,7$), 9 ($182,5 \pm 25,2$) y 17 ($66,1 \pm 37,8$).

Tercera evaluación en vivero

En el mes de octubre, tras 6 meses de implantación en vivero, el control micropropagado alcanzaba los valores máximos en cuanto a número de estolones de primer orden por planta ($38,3 \pm 4,3$), seguido muy de cerca por el clon 21 con $36 \pm 3,8$ estolones. En general, la tendencia, en cuanto a capacidad de estolonado, se mantuvo con respecto a la que tenían tres meses antes, aunque en este caso todas las líneas estolonaron. Los protoclonos 13 y 17 no se pudieron llevar a campo de fructificación en Huelva porque murieron.

En relación al número medio de plantas hijas por protoclón también se observaron diferencias claras entre los distintos protoclonos. El control micropropagado, con $535,7 \pm 16,6$ plantas hijas por planta madre, sólo fue superado por el protoclón 21 ($584,3 \pm 214,5$). El resto de protoclonos presentaban una gran variabilidad, con valores que oscilaban entre 0,5 y 399,7, lo cual indica una clara desigualdad en el vigor y estado de las plantas madres. Destacaron con valores medios-altos los protoclonos 20 ($399,7 \pm 131,4$), 11 ($220,3 \pm 63,9$), 2 ($219,7 \pm 25$), 8 ($190,3 \pm 4,4$), 4 ($177,7 \pm 102,7$), 3 ($151,7 \pm 22,9$) y el clón 1 ($151,3 \pm 7,5$), mientras que presentaban valores bajos los clones 5 ($0,5 \pm 0,5$), 24 ($13,7 \pm 5$), 15 ($16,5 \pm 6,5$) y 23 ($18,7 \pm 1,2$), concordando estos datos con los obtenidos en número de estolones por planta.

El aspecto de las plantas hijas era en general muy bueno, predominando el color verde, a excepción de los clones 6, 8, 19 y 22 con un 33,3% de plantas ligeramente cloróticas y los clones 4, 24 y 26 con un

66,7%, mientras que el clon 23 presentó un 33,3% de plantas verdes, 33,3% ligeramente cloróticas y 33,3% cloróticas.

El número de foliolos en hojas de una planta madura es 3; sin embargo, en los protoclonos 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14 y 22, aparecían hojas con 4 y 5 foliolos, carácter que se transmite también a las plantas hijas, obtenidas mediante estolonado. No se observaron alteraciones claras en la morfología de las mismas.

V.3.6 Comportamiento de los protoclonos en el campo de fructificación (F1)

Las plantas de la generación hija (F1) fueron cultivadas en condiciones de explotación comercial, bajo cubierta en macrotunel, en la finca experimental El Cebollar (IFAPA, Centro de Huelva) para su evaluación agronómica. Se plantaron 22 protoclonos diferentes, ya que 4 líneas murieron durante la fase de multiplicación en vivero, junto con un control micropropagado y otro macropropagado que no había pasado por cultivo *in vitro*.

V.3.6.1 Caracteres morfológicos de las plantas

El hábito de crecimiento, en la mayoría de los clones, incluidos los controles macro y micropropagado, era de tipo normal-erecto, mientras que los clones 12, 18, y 23 presentaban porte rastrero, y el clon 20 crecimiento erecto (Tabla 3).

Las variaciones encontradas en el área de la planta en F0, se mantuvieron en la primera generación vegetativa; así, el control micropropagado (632,9 cm²) tuvo un porte mayor que el macropropagado (483,5 cm²), y ambos fueron superados por los clones 2, 6, 7, 8, 11, 20, 21, 22 y 24 como se puede apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3. Características generales de diferentes protoclonos de fresa obtenidos a partir de plantas *in vitro*, cultivar Chandler. Las plantas F0 se multiplicaron mediante estolonado para obtener la primera generación vegetativa. Los datos corresponden a los siete meses desde su establecimiento en campo (F1).

Clon	Hábito de Crecimiento	Frondosidad	Area (cm ²)	Anomalías en N°. foliolos	Color hoja
C macro	normal-erecto	baja-media	483,5	ninguna	verde-verde oscuro
C micro	normal-erecto	baja-media	632,9	ninguna	verde claro-verde
1	normal	media-alta	468,3	baja	clorótico
2	normal-erecto	media-alta	678,2	alta	verde claro-verde
3	normal	media-alta	640,4	ninguna	clorótico-verde claro
4	rastrero-normal	baja-media	405,7	baja	clorótico
6	rastrero-normal	media-alta	741,2	baja	verde claro-verde
7	normal-erecto	media-alta	664,4	ninguna	verde-verde oscuro
8	normal-erecto	media-alta	696,6	alta	verde claro-verde
9	normal-erecto	baja-media	490	ninguna	clorótico-verde claro
10	rastrero-normal	baja-media	348,5	alta	clorótico-verde claro
11	normal-erecto	media-alta	708,4	todas	clorótico-verde claro
12	rastrero	media-alta	393,3	ninguna	clorótico-verde claro
15	normal	media-alta	536,4	ninguna	verde claro-verde
18	rastrero	baja-media	371,5	baja	clorótico
19	rastrero-normal	baja-media	422,6	ninguna	clorótico
20	erecto	media-alta	691,9	baja	clorótico-verde claro
21	normal-erecto	media-alta	738,6	ninguna	verde oscuro
22	normal-erecto	media-alta	882,5	alta	verde claro-verde
23	rastrero	baja-media	261,4	ninguna	clorótico-verde claro
24	normal	media-alta	687,5	ninguna	verde-verde oscuro
26	normal	baja-media	551,1	ninguna	clorótico-verde claro
27	rastrero-normal	baja-media	314,1	ninguna	verde-verde oscuro

Los valores de este parámetro variaron entre un mínimo de 261,4 cm² para el clon 23, y un máximo de 882,4 cm² para el protoclon 22. En general, se observó una relación directamente proporcional entre el área de las plantas y la frondosidad de las mismas.

El color de las hojas también presentaba diferencias entre las líneas (Tabla 3); así, éstas tenían tonalidades que variaban desde clorótica hasta verde oscuro. El control micropropagado tenía tonos verde claro-verde, mientras que el macropropagado era de un color más intenso, entre verde y verde oscuro. Imágenes de algunos protoclonos en el campo de fructificación se muestran en la Figura 18.



Figura 18. Protoclonos establecidos en invernadero de la finca experimental “El Cebollar”, Moguer (Huelva), a partir de protoplastos de fresa, cv. Chandler. Las plantas se obtuvieron vía organogénesis adventicia. A: protoclon 2. B: protoclon 4. C: protoclon 6. D: protoclon 22.

Respecto al número de folíolos en las hojas, encontramos clones con todas las hojas trifoliadas, clones con todas las hojas con un número de folíolos distinto a tres (clon 11), así como otros con alta (clones 2, 8, 10, 22) o baja frecuencia en el número de folíolos diferente a tres (clones 1, 4, 6, 18 y 20). Los controles presentaban todas sus hojas con tres folíolos, el número normal para una planta con un correcto desarrollo vegetativo.

V.3.6.2 Fructificación

Los datos de producción acumulada, estimada como gramos de frutos de primera y segunda categoría producidos por planta, así como los porcentajes con respecto al control macropropagado, al que se le asignó un valor de 100%, se muestran en la Tabla 4. Las plantas se mantuvieron en campo durante siete meses, y los datos de fructificación se tomaron durante los últimos tres meses. Los valores de producción en los controles micropropagados fueron superiores a los obtenidos en los controles macropropagados, si bien las diferencias no fueron significativas. En cuanto a los protoclonos, la mayoría de las líneas, 17 de 21, dieron una producción significativamente inferior a los controles micro o macropropagado. Algunos clones mostraron una producción extremadamente baja, por debajo incluso de los 6 g de fruto por planta, como fue el caso de los protoclonos 15, 18 y 23. Los protoclonos 3 y 26 dieron valores de producción intermedios, no siendo significativamente diferentes de la producción obtenida en el control macropropagado. Sólo las líneas 2, 9 y 21 dieron una producción similar a ambos controles, lo que representa un 14,3% del total de líneas evaluadas.

Tabla 4. Fructificación de protoclones obtenidos a partir de plantas de fresa, cv. Chandler, mantenidas *in vitro*. Las plantas F0 se multiplicaron mediante estolonado para obtener la primera generación vegetativa (F1).

Clon	Producción acumulada (g/planta)	Producción respecto C macropropagado (%)	Peso de fruto (g)
C macro	418,7	100,0	12,2
C micro	539,6	128,9	14,2
1	21,5 ^{a,b}	5,1	5,0
2	472,6	112,9	15,6
3	266,2 ^a	63,6	8,5
4	168,8 ^{a,b}	40,3	11,2
6	83,7 ^{a,b}	20,0	10,6
7	207,3 ^{a,b}	49,5	9,5
8	105,5 ^{a,b}	25,2	10,8
9	408,5	97,6	8,6
10	205,9 ^{a,b}	49,2	18,8
11	116,3 ^{a,b}	27,8	13,5
12	63,2 ^{a,b}	15,1	6,1
15	5,6 ^{a,b}	1,3	
18	1,5 ^{a,b}	0,3	
19	138,1 ^{a,b}	33,0	9,4
20	290,9	69,5	13,5
21	408,1	97,5	9,8
22	78,4 ^{a,b}	18,7	18,0
23	4,2 ^{a,b}	1,0	
24	259,8 ^{a,b}	62,0	8,2
26	220,5 ^a	52,7	9,3
27	67,3 ^{a,b}	16,1	4,1

Las letras (a y b) indica diferencias significativas con respecto al control micropropagado y macropropagado, respectivamente, mediante el test *t*-Student a $P=0,05$.

En cuanto al peso medio de fruto (Tabla 4), el control micropropagado también produjo frutos de mayor tamaño que el macropropagado; y aunque en general la mayoría de los protoclonos obtenidos dieron frutos de calibre inferior a ambos, las líneas 2, 10 y 22 destacaron por producir los frutos más grandes.

Se observó que los clones que menos fructificaban presentaban un crecimiento entre rastrero y normal, y un área menor, mientras que aquellos clones que más producían tenían un crecimiento erecto o normal-erecto, incluidos los controles, siendo además las plantas de mayor tamaño, con una superficie de la parte aérea, en torno a 500 cm², a excepción del clon 9, que siendo muy productivo tenía un porte menor.

V.3.6.3. Morfología de los frutos

En la Tabla 5, se muestra un resumen de los rasgos morfológicos evaluados en los frutos procedentes de los distintos protoclonos (Figura 19). En general, se puede observar, como la cavidad interna del fruto o no existía o era pequeña, como ocurría en ambos controles, y en ningún caso, observamos protoclonos cuyos frutos mostraran una cavidad interna grande. El color interno fue predominantemente rojo con variaciones; el control macropropagado presentó frutos, en su mayoría, con tonalidades internas de rojo claro-rojo, al igual que los protoclonos 4 y 26, mientras que el control micropropagado, presentaba frutos con un color interno rojo-rojo oscuro, coincidiendo con los protoclonos 3, 7, 9, 10 y 19; el resto, dio frutos de color blanco-rojo claro, rojo claro y rojo. Sólo el protoclon 6 tenía frutos blancos. El color externo de los frutos, evaluado con un colorímetro manual, osciló entre 4 y 6, los controles con un valor de 6, fueron superados por los protoclonos 8 y 19, ambos con un valor de 7. El protoclon 6, con cavidad interna blanca, dio frutos también mucho más claros que el resto de protoclonos.

Tabla 5. Caracteres morfológicos de frutos procedentes de protoclones obtenidos a partir de plantas de fresa, cv. Chandler, mantenidas *in vitro*. Las plantas F0 se multiplicaron mediante estolonado para obtener la primera generación vegetativa (F1). Los datos corresponden a los frutos de las plantas establecidas en campo durante el último mes de cultivo.

Clon	Cavidad interna	Color interno	Color externo	Forma más frecuente
C macro	ausente-media	rojo claro-rojo	6,0±0,6	bicónica
C micro	ausente-media	rojo-rojo oscuro	6,0±0	bicónica
1	ausente	rojo	5,0±0	ventosa
2	media	rojo	5,0±0,6	acorazonada, multilobular
3	media	rojo-rojo oscuro	5,0±0	acorazonada, multilobular
4	ausente-media	rojo claro-rojo	5,7±0,3	globosa, acorazonada, cuneiforme corta
6	ausente	blanco	1,0±0	ventosa
7	ausente	rojo-rojo oscuro	4,7±0,3	cónica, cuneiforme larga, multilobular
8	ausente-media	rojo	7,0±1	ventosa, campaniforme
9	media	rojo-rojo oscuro	6,0±1	multilobular, ventosa
10	media	rojo-rojo oscuro	6,0±0	cónica, cuneiforme corta
11	ausente	rojo claro	4,0±0	campaniforme
12	ausente	rojo	5,0±0	campaniforme
19	ausente	rojo-rojo oscuro	7,0±0	bicónica, campaniforme
20	ausente-media	rojo medio	5,5±0,5	acorazonada, cónica
21	ausente	rojo medio	4,7±0,3	cónica
22	ausente-media	blanco-rojo claro	6,0±0	multilobular, campaniforme
24	ausente	blanco-rojo claro	4,7±0,9	multilobular, ventosa
26	ausente-media	rojo claro-rojo	5,7±0,7	cuneiforme corta, multilobular
27	ausente	rojo claro	4,5±0,5	campaniforme



Figura 19. Frutos recolectados para ser evaluados morfológicamente, procedentes de plantas obtenidas vía organogénesis adventicia, a partir de protoplastos de fresa, cv. Chandler.

La forma de los frutos era variable (Figura 20); aunque los frutos de ambos controles tenían una forma bicónica. En el resto de protoclonos hubo bastante variabilidad en la apariencia, desde ventosa (protoclonos 1, 6, 8, 9 y 24), acorazonada (2, 3, 4 y 20), cuneiforme corta (4, 10 y 26), cónica (7, 10, 20 y 21), multilobular (2, 3, 7, 9, 22, 24 y 26), y campaniforme (8, 11, 12, 19, 22 y 27).

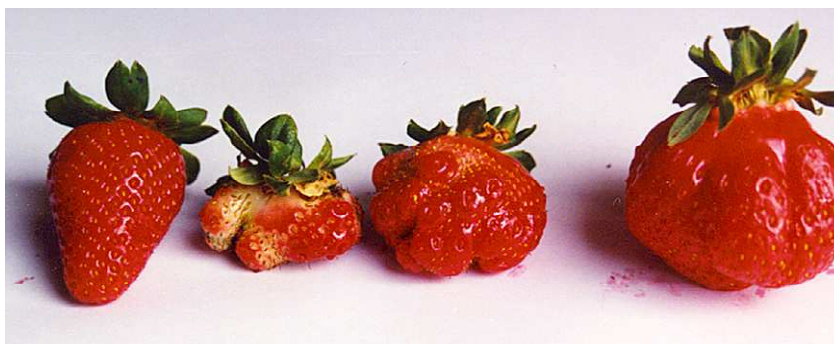


Figura 20. Frutos procedentes de diferentes clones obtenidos vía organogénesis adventicia, a partir de protoplastos de fresa, cv. Chandler.

Por otra parte, es interesante señalar que tras su implantación en el campo de Huelva, algunos protoclonos presentaban frutos anómalos con presencia de filodios, clones 6, 7, 11 y 22; además, tenían sépalos muy marcados y separados. En el caso del protoclon 22, los filodios se habían desarrollado dando incluso una planta completa.

En general, los protoclonos que produjeron frutos con morfología más similar a la del control fueron las líneas 7, 10, 19, 20 y 21, con presencia de formas bicónica, cónica, cuneiforme corta y larga.

V.3. 6.4 Dureza media de los frutos maduros

La firmeza externa de los frutos, se evaluó con un penetrómetro manual, expresándose los resultados en gramos (Figura 21).

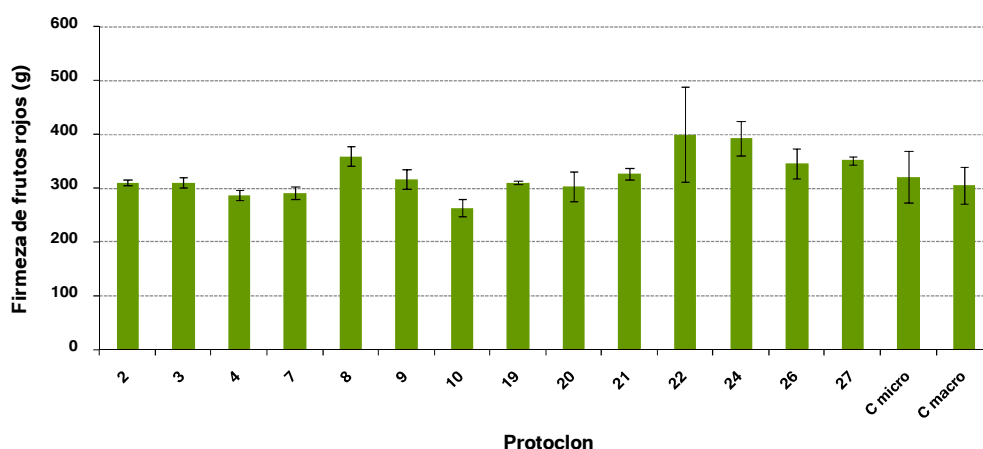


Figura 21. Dureza media de frutos maduros por clon. Las plantas se obtuvieron vía organogénesis adventicia a partir de protoplastos de fresa, cultivar Chandler.

Se eliminaron aquellos clones que, o no habían fructificado o sólo produjeron frutos en un sólo bloque de los tres analizados, clones 1, 6, 11 y

12. No se encontraron diferencias significativas entre los controles macro y micropropagado, y el resto de protoclonos.

V.3. 7 Estabilidad genética de los protoclonos

En un primer estudio, se analizó el nivel de ploidía en 6 protoclonos escogidos al azar, líneas 4, 6, 8, 11, 22 y 24. Todas estas líneas mostraron valores de producción inferior al control y morfología de fruto muy variable. Los histogramas obtenidos no revelaron diferencias en el nivel de ploidia entre los protoclonos analizados y el control octoploide Chandler (resultados no mostrados).

Posteriormente, se realizó un análisis de variabilidad genética mediante marcadores microsatélites en 10 de las 21 líneas analizadas en campo, utilizando plantas micropropagadas como control. El dendograma obtenido (Figura 22) mostró que el clon 21 era el más cercano al control, aunque aparece en un grupo independiente. Un coeficiente de similitud de 1 estaría indicando un 100% de igualdad entre las muestras. En nuestros resultados, el control micropropagado y el clon 21, siendo distintos, se unen mediante un coeficiente de similitud de 0,94, lo que nos indicaría que el 94% de los marcadores estudiados son iguales y sólo el 6% son distintos. Es de destacar que este clon también se mostró como el clon más parecido al control, tras la evaluación morfológica, en cuanto a número de estolones de primer orden y área de planta, siendo además, uno de los más productivos. El segundo grupo formado por los protoclonos 3, 9 y 26, se une al anterior, con un coeficiente de similitud de 0,90, lo que quiere decir que existe una igualdad entre ambos grupos de un 90% en base a los microsatélites analizados, y por tanto, un 10% de diferencia. Finalmente, se obtenía un último grupo incluyendo por un lado a un clon muy productivo (clon 2), cuatro de producción intermedia (clones 4, 8, 11, y 20), y uno de muy baja producción

(clon 18). Curiosamente, todos los clones de este último grupo tenían hojas con 4 ó 5 foliolos. El dendograma nos muestra como los tres grupos diferenciados, se unen con un coeficiente de similitud de 0,85, es decir, todos los protoclonos comparten los mismos microsatélites al 85%, diferenciándose en un 15%. Estos resultados nos indican que se ha producido variabilidad genética en los protoclonos obtenidos, y que aunque esta no sea muy grande, los cambios producidos son significativos.

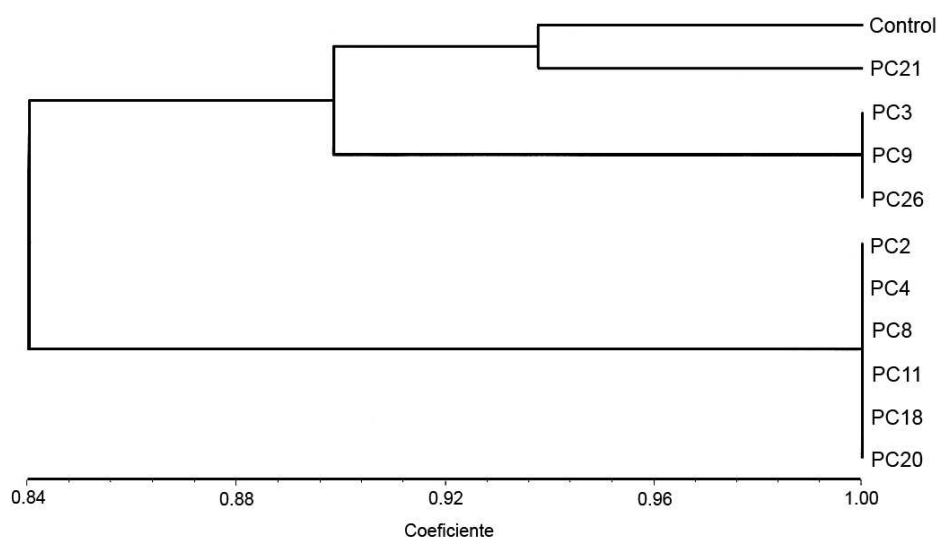


Figura 22. Dendograma representando el coeficiente de similitud entre distintos protoclonos de fresa, cv. Chandler, mediante el método UPGMA, a partir de los datos de presencia-ausencia de microsatélites.

V.4. Discusión

Son numerosas las referencias respecto a la falta de reproducibilidad de los protocolos de aislamiento y cultivo de protoplastos (Eriksson, 1988; Debthnath, 2007; Andreu y col., 2008), y escasos los estudios publicados describiendo dicha metodología en fresa. En el presente trabajo, y tomando

como base el sistema puesto a punto por Nyman y Wallin (1988) en *Fragaria x ananassa*, cvs. Sengana y Canoga, se ha desarrollado un protocolo eficiente de obtención de protoplastos en el cultivar Chandler, con unos porcentajes de supervivencia que oscilan entre un 74% y un 87%.

El éxito en el aislamiento de protoplastos viables capaces de producir división y crecimiento celular, depende en gran parte del genotipo y del estado de la planta madre, y aunque el desconocimiento es grande acerca de las condiciones óptimas y los factores implicados, la alteración del material mediante la manipulación del mismo durante el cultivo *in vitro*, puede afectar notablemente al éxito en la respuesta. Sadia (2015) observó cómo en patata la producción y la viabilidad de los protoplastos obtenidos era genotipo dependiente. Nuestros resultados corroboran las observaciones previas de Nyman y Wallin (1992) en *Fragaria*, quienes indican la necesidad de optimizar el protocolo para cualquier nuevo cultivar.

V.4.1 Pretratamiento de la fuente de material

El estado fisiológico del material de partida es importante (Ortín Párraga y Burgos, 2003). Así, Nyman y Wallin (1988) ya indicaban que el cultivo en un medio con alta citoquinina era importante, pues estimulaba el crecimiento vegetativo más que el almacenaje de carbono fijado, por lo que habría una menor cantidad de carbono en las paredes celulares, y esto facilitaría la obtención de protoplastos. En nuestro caso, al transferir el material a un medio suplementado con baja sacarosa y mayor cantidad de la citoquinina BA, se indujo un estado hiperhídrico en los brotes, crucial para la obtención de protoplastos. Además, el crecimiento de los cultivos en un medio con menor contenido de carbohidratos, disminuye el azúcar intracelular disponible para la síntesis de la pared, lo que podría resultar en una reducción del espesor de las paredes celulares, siendo por tanto los

protoplastos más fácilmente separables (Warren, 1991). Por otro lado, comprobamos como la duración del último subcultivo en este medio afectaba a la supervivencia de los protoplastos. Ortín Párraga y Burgos (2003) en melocotón, obtuvieron los mejores resultados cuando el material se obtuvo a partir de brotes *in vitro*, tomados 21 días después del subcultivo. Por otro lado, está ampliamente aceptada la influencia negativa que ejerce la presencia de productos fenólicos en la obtención de protoplastos viables (Warren, 1991). Además, Boulay (1985) indicaba que la inducción de un estado hiperhídrico en algunos casos podía ser reversible, mientras que en otros, podía llevar a la muerte celular. En el presente trabajo, se estableció como óptimo un periodo de 3 semanas para el último subcultivo, en el medio inductor de hiperhidricidad, evitando tanto la aparición de compuestos fenólicos como provocar daños irreversibles en el material vegetal, que afectasen negativamente a la viabilidad de los protoplastos obtenidos.

V.4.2 Aislamiento y purificación de los protoplastos

El aislamiento de protoplastos en sí es un proceso inductor de estrés (Papadakis y col., 2001; Papadakis y Roubelakis Angelaskis, 2002), especialmente durante el tratamiento enzimático, acumulándose productos de la degradación que inducen rotura celular. Este estrés resulta también de las condiciones osmóticas requeridas durante el aislamiento ya que en tejidos intactos expuestos a condiciones de plasmólisis, el comportamiento observado es una respuesta a las condiciones de estrés osmótico más que a la desaparición de la pared celular (Warren, 1991).

El empleo de sacarosa en el aislamiento y purificación de los protoplastos de fresa, en lugar de otros azúcares-alcohol de metabolización lenta como el manitol o el sorbitol, tiene como desventaja que puede ser absorbido por las células, con lo que el potencial osmótico del medio decae,

pudiendo causar problemas en la estabilización de los protoplastos; sin embargo, en otras ocasiones, esto podría ser ventajoso en cuanto que se mantiene una progresiva disminución del valor osmótico del medio, que muchos protoplastos requieren conforme van sufriendo divisiones y se forman colonias (Warren, 1991). Un aumento en la concentración de sacarosa en el medio CPW de lavado de 16% a 21%, mejoró el aislamiento al incrementarse la viabilidad de los protoplastos desde un 64% hasta un 77%; sin embargo, Nyman y Wallin (1988) utilizaban para los cultivares de fresa Sengana y Canoga CPW 16%, mientras que Infante y Rosati (1993) recomiendan CPW 18% para *Fragaria vesca* Alpine, lo cual corrobora la necesidad de ajustar los protocolos a cada cultivar.

Los protoplastos de células conteniendo cloroplastos tienen densidades altas, mientras que los protoplastos de células con grandes vacuolas y plastidios pequeños, muestran densidades bajas. La creación de gradientes permite, además de purificar, fraccionar la población de protoplastos en bandas de diferentes densidades de flotación. Los gradientes de sustancias inactivas osmóticamente como el percoll, en combinación con un osmótico de baja densidad como la sacarosa, pueden producir poblaciones limpias (Potrykus y Shillito, 1986). En el cultivar Chandler, los protoplastos obtenidos presentaban diferencias en tamaño, densidad y tipo celular, lo cual dificultaba aún más la separación entre protoplastos y detritus; por ello, se evaluó la creación de un gradiente de densidad mediante el empleo de una solución de percoll-sacarosa 0,4 M, que incrementó en un 10% el éxito en el aislamiento. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los obtenidos por Nyman y Wallin (1992a) en la línea de mejora 77101; así, mientras estos autores observan como tras la utilización de un gradiente de densidad pierden una cantidad importante de protoplastos que precipitan con el detritus y restos de material celular, al ser una gran parte de los protoplastos obtenidos pequeños

y muy pesados, en nuestro caso, se conseguía recuperar una fracción significativamente superior a la obtenida sin gradiente de densidad, probablemente porque en hojas hiperhídricas de Chandler, predominan los protoplastos de baja densidad.

V.4.3 Cultivo y regeneración de plantas

En la primera fase del cultivo, los protoplastos inician la regeneración de la pared celular en un corto periodo de tiempo. En fresa, la reducción de la presión osmótica se consiguió mediante diluciones semanales de la concentración de glucosa desde 0,4 M hasta 0,2 M; además, al irse metabolizando la glucosa, el valor de la presión osmótica disminuía gradualmente conforme crecían los protoplastos. Sin embargo, además de un osmótico, el medio de cultivo requiere una serie de componentes orgánicos o nutrientes complejos que satisfagan las necesidades metabólicas de los protoplastos (Warren, 1991). El medio 8p (Kao y Michayluk, 1975) es un medio complejo y rico, conteniendo leche de coco y vitaminas, que ha sido muy utilizado en un amplio rango de especies, incluyendo leguminosas, cereales, ornamentales y árboles frutales (Bhojwani y Dantu, 2013). En fresa, siguiendo las observaciones de Nyman (1988), utilizamos la modificación de este medio recomendada por Glimelius (1986), siendo el aporte de citoquininas menor que el de auxinas, para permitir la división celular. Por otra parte, aunque el agar puede resultar efectivo en algunos casos, el empleo de agarosa como agente gelificante suele dar mejores resultados (Potrykus y Shillito, 1986), evitándose problemas relacionados con la toxicidad de las impurezas encontradas en el agar (Warren, 1991). En fresa, el principal problema es la baja supervivencia de los protoplastos durante el primer día después de su aislamiento; por ello, se evaluó el efecto que la duración del periodo de cultivo en agarosa tenía sobre la viabilidad. El cultivo en presencia de este

agente gelificante evita fenómenos de agregación, estabiliza las membranas y reduce la difusión de precursores de pared fuera de los protoplastos (Shillito y col., 1983; Chen y col., 1988). En el cultivar Chandler, el mantener los protoplastos incluidos en agarosa, al menos 48 horas antes de la adición del medio líquido, incrementaba en un 13% la viabilidad de los mismos; además, tal y como señalan Nyman y Wallin (1992a), este sistema permite reponer fácilmente el medio, sin afectar a la densidad celular. Por otro lado, de este modo se consigue reducir progresivamente la presión osmótica del medio desde un nivel relativamente alto al principio, a otros más bajos conforme se van desarrollando los cultivos, garantizando además, que en ausencia de la pared celular, no se inhiba el desarrollo de los protoplastos (Potrykus y Shillito, 1986).

V.4.3.1 Densidad de cultivo

Potrykus y Shillito (1986) señalaban ya como rango habitual una densidad de 2×10^4 y 2×10^5 protoplastos. ml^{-1} , que se podía incrementar cuando disminuía el tamaño de los protoplastos y viceversa. Bhojwani y Dantu (2013) mencionan también la importancia de este factor, estableciendo el óptimo entre 5×10^4 y 1×10^5 protoplastos. ml^{-1} . Nyman y Wallin (1988, 1992), en los cultivares de fresa Sengana y Canoga, así como en la línea de mejora 77101, sugieren cultivar a una densidad de 5×10^4 protoplastos. ml^{-1} , para evitar de este modo problemas de excesiva formación de agregados; sin embargo, en el cv. Chandler se observó que el inicio de las primeras divisiones era estimulado por una densidad de cultivo superior (10^5 y 2×10^5 protoplastos. ml^{-1}), coincidiendo con los resultados obtenidos en melocotón por Ortín Párraga y Burgos (2003). En condiciones de alta densidad aumenta el contacto celular, necesario para el posterior crecimiento de los microcallos (Morgan, 1999); además, las células estimulan el crecimiento de células adyacentes mediante

la liberación de factores de crecimiento, fenómeno conocido como “acondicionamiento del medio” (Davey y col., 2005). En general, la densidad óptima varía en función del cultivar; de hecho, en algunos casos, una densidad alta puede resultar perjudicial ya que la proporción de protoplastos muertos tiene un efecto negativo sobre los protoplastos viables; además, en estos casos, no es raro que exista una competencia por la adquisición de nutrientes (Warren, 1991).

V.4.3.2 Formación de microcallos

Los requerimientos nutricionales de los protoplastos van cambiando con frecuencia durante el cultivo, necesitando modificaciones en la composición del medio, que normalmente incluyen una reducción del contenido de auxinas (Davey y col., 2005). En fresa, en el medio de regeneración de microcallos, se redujeron las auxinas y se aumentaron las citoquininas; así, a los protoplastos cultivados inicialmente en medio 8p modificado, conteniendo 1 mg.l⁻¹ ANA y 0,5 mg.l⁻¹ BA y 0,6% agarosa, se les agregó finalmente, medio 8p modificado líquido, suplementado con 0,1 mg.l⁻¹ ANA y 1 mg.l⁻¹ BA y 2% sacarosa hasta obtener microcallos visibles.

No se observaron diferencias claras en la capacidad de proliferación de los microcallos y en la posterior regeneración de brotes adventicios, al utilizar las citoquininas BA o TDZ, aunque en algunos casos se observó un crecimiento celular más rápido en presencia de ésta última. Así mismo, el uso de la hormona TDZ con la que Nyman y Wallin (1992a) obtenían los mejores resultados, parecía inducir una respuesta más precoz en los microcallos, pero se obtuvieron mejores resultados con el uso de altas concentraciones de la citoquinina BA, llegando a obtener hasta un 24% de regeneración tras 16 semanas de cultivo.

V.4.4 Evaluación de los protoclonos y estabilidad genética

El mecanismo regulador del ciclo celular puede jugar un papel directo en el crecimiento y la morfogénesis en plantas, de modo que cualquier alteración en el proceso normal del ciclo puede causar variación somaclonal (Bairu, 2011). Así, durante el cultivo de protoplastos, errores en la síntesis de los microtúbulos, formación y orientación del huso, segregación de cromátidas y formación de la pared celular pueden generar variaciones en el número y estructura de los cromosomas (Karp, 1994). Además, Karp (1993) señala que la variación somaclonal encontrada en plantas derivadas de protoplastos es mayor que en aquellas que proceden de explantos que mantienen un alto grado de organización. Por otra parte, está aceptado que algunos cambios surgen *in vitro* con mucha más frecuencia de la esperada y sobre todo, que algunas de estas alteraciones aparecen únicamente como consecuencia del cultivo celular; además, la regeneración de plantas a partir de protoplastos se asocia normalmente con inestabilidad cromosómica, siendo la variación más comúnmente observada la poliploidización. La poliploidía que, en ocasiones, puede representar una ventaja evolutiva al facilitar la adaptación de las especies gracias a la presencia de juegos múltiples de material génico, en general suele ir asociada a inestabilidades génicas, desequilibrios cromosómicos, fenómenos de incompatibilidad y fallos reproductivos (Chen, 2007). Por otra parte, son conocidas las alteraciones morfológicas producidas como consecuencia de variaciones en el nivel de ploidía, y que se traducen en aumentos de tamaño en órganos reproductivos y partes vegetativas de las plantas (Murti y col., 2012). Así, Wu y col. (2012) consiguieron aumentar el tamaño y forma de los frutos de kiwi en individuos autotetraploides obtenidos a partir de plantas diploides. En fresa, Murti y col. (2012) observaron cómo aumentos en el nivel de ploidía se traducían en cambios morfológicos en hojas y flores, obteniendo mutantes con peciolo de mayor diámetro y hojas

más gruesas. Sin embargo, no encontraron una clara correlación entre el aumento en grosor de hojas y peciolo y el incremento en el nivel de ploidía, de modo que, supuestamente, el grosor permanecería constante a partir de un cierto nivel de ploidía. Por su parte, Nyman y Wallin (1992a) encontraron altos niveles de ploidía en las plantas obtenidas a partir de protoplastos, observando además la existencia de una correspondencia entre ciertas anomalías en su morfología y la duplicación cromosómica, de modo que las hojas y peciolo de las plantas 16x y mixoploides, eran más gruesas y rígidas que las de las plantas octoploides; sin embargo, estas últimas tenían más hojas (Nyman, 1993). Además, encontraron como el color de las hojas en plantas 16x era verde oscuro, siendo en las plantas mixoploides verde oscuro o variegado. También encontraron algunas diferencias en la morfología y color de las hojas en las plantas octoploides, derivadas de protoplastos, aunque en general, éstas se parecían a las plantas control. En nuestro caso, y dentro de los 6 clones en los que se evaluó el nivel de ploidía y que resultó ser similar al control, también se observó una gran variación en el color de las hojas, encontrando desde clones claramente cloróticos, a otros que mostraban clorosis tendiendo a verde claro, o color verde claro con tendencia a verde, verde tendiendo a verde oscuro y verde oscuro. Estas variaciones en el color de la hoja también fueron observadas en los controles, apareciendo el control micropropagado de color verde claro y el macropropagado con color verde con tendencia a oscuro. Sin embargo, el análisis de microsatélites sí agrupó al clon 21 con el control macropropagado (ambos de color verde oscuro), aunque el hecho de que tanto el control micropropagado como la mayoría de los clones presentaran color clorótico-verde claro, hace pensar que el aporte de hierro a las plantas, en condiciones de campo, no fuera el más adecuado.

En relación al número de folíolos en hoja, obtuvimos gran variabilidad, al igual que Nyman (1993) en la línea de mejora 77101; esta autora observó

que todas las plantas procedentes de callo, incluido el control, presentaban hojas desde bi hasta hexafoliadas, siendo este carácter predominante en plantas mixoploides y especialmente hexadecaploides (16x). En nuestro caso, los protoclonos 2, 4, 8 y 11, todos ellos pertenecientes al grupo más alejado del control Chandler, presentaron hojas con 4 y 5 foliolos en la tercera evaluación realizada en vivero en el IFAPA de Málaga (F0). Estos resultados fueron confirmados posteriormente en la evaluación realizada en la generación hija (F1), en el campo de fructificación en el IFAPA de Huelva, ya que, mientras que el control y los protoclonos 21, así como el 3, 9 y 26, pertenecientes a los dos grupos más próximos al control, no mostraron ninguna hoja con un número de foliolos distinto de tres; sin embargo, aquellos más alejados del control, clones 4, 18 y 20, tenían algunas, y el 2 y 8 muchas. Finalmente, en el protoclón 11, ninguna hoja tuvo 3 foliolos, a pesar de que su nivel de ploidia era igual al del control.

En cuanto a la frondosidad, no se observó una relación clara entre la misma y las distancias establecidas con respecto al control mediante marcadores microsatélites.

En relación con la capacidad de estolonado, tanto el control Chandler como el protoclón 21 formaron muchos estolones; sin embargo, en el resto de clones las diferencias a nivel de microsatélites no mostraban relación alguna con este carácter, pues entre los clones próximos al control había alguno (clon 3) con alta y otros 2 con baja capacidad de estolonado (9 y 26). Nyman (1993) también encontró diferencias en la floración, de modo que las plantas mixoploides y 16x producían flores más grandes y con más pétalos que las octoploides, aunque tenían un número significativamente inferior al de los protoclonos octoploides. En el presente trabajo, encontramos gran variabilidad en el número de ramilletes florales producidos; no observándose, sin embargo, una relación clara entre este carácter y el resultado obtenido en el

dendograma de similitud genética, ya que protoclonos de los tres grupos (clones 21, 3, 8 y 11), produjeron un elevado número de ramilletes florales, mientras que en el control micropropagado se observó lo contrario.

Respecto a la capacidad de fructificación, Nyman (1993) obtuvo frutos en los diferentes protoclonos evaluados, aunque estos eran más pequeños que los de las plantas control, y en ocasiones nodulados. En el presente trabajo, la producción obtenida fue muy variable, encontrándose diferencias significativas entre los controles y muchas de las líneas analizadas; sin embargo, se encontraron líneas de alta producción en los 3 grupos de variabilidad establecidos mediante marcadores microsatélites.

La ausencia de cambios en el nivel de ploidía en los clones analizados de Chandler, discrepan con los resultados obtenido por Nyman y Wallin (1992a) en otros cultivares de fresa y podrían deberse al propio genotipo o al medio de cultivo, ya que estos autores utilizan la auxina 2,4D, cuyo efecto en inducción de poliploidía es conocido (Sunderland, 1977). En cualquier caso, estas diferencias en cambios genéticos en material derivado de protoplastos también se han observado en otras especies; así, Sadia (2015) encontró variaciones en el nivel de ploidía en protoclonos de patata obtenidos a partir de disco de hoja; además, las plantas mostraban un menor número de hojas primarias y secundarias, menor longitud de los tallos, así como menor número de tubérculos por planta y peso de los mismos. Sin embargo, Jones y col. (1989), también en patata, obtuvieron protoclonos a partir de mesófilo de hoja con el mismo nivel de ploidía que sus parentales, por lo que en este caso, los cambios estructurales podrían ser la causa de las variaciones observadas. La patata es un cultivo tetraploide y heterocigoto, al igual que la fresa, y se han obtenido variantes somaclonales estables en el hábito de crecimiento, tiempo de maduración, uniformidad y color de la piel de los tubérculos, así como

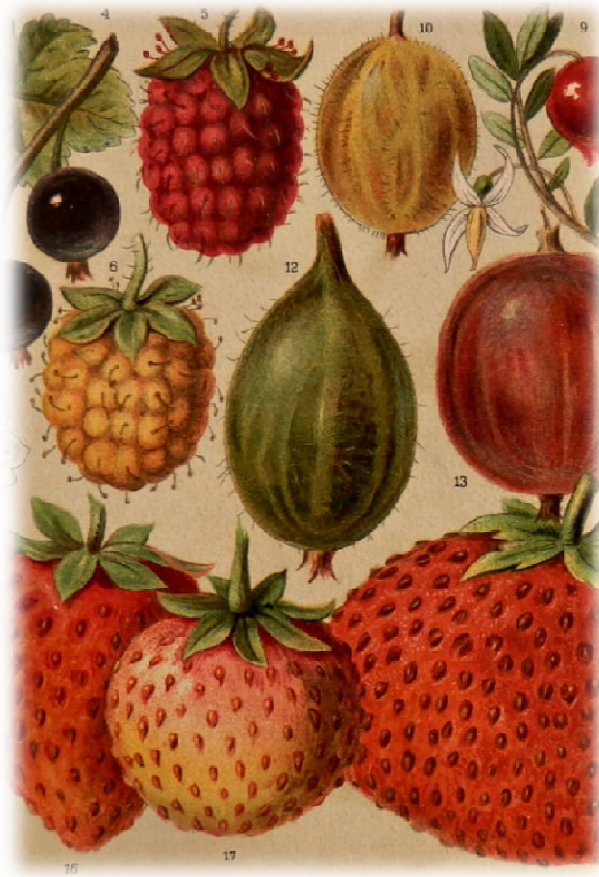
mayor resistencia, en algunos casos, a ciertos patógenos (Nwauzoma y Jaja, 2013).

V.5. Conclusiones

Se ha optimizado un protocolo para la obtención y cultivo de protoplastos, así como para la regeneración de plantas en el cultivar de fresa Chandler. La obtención de protoplastos es genotipo dependiente; así mismo, el estado fisiológico de la fuente de material y la calidad de los protoplastos obtenidos son factores críticos, y más importantes incluso que las propias condiciones de cultivo, por lo tanto, es crucial adaptar los protocolos a cada cultivar, y realizar evaluaciones morfológicas en campo de, al menos, dos generaciones de plantas (F0 y F1).

Se ha observado variabilidad morfológica en el material obtenido tras la evaluación agronómica; la más importante está relacionada con la capacidad de fructificación. Además, se obtuvieron otras diferencias agronómicas destacables en el hábito de crecimiento, forma de frutos, capacidad de estolonado, número de ramilletes florales o número de foliolos en hoja.

Los análisis mediante microsatélites permitieron detectar diferencias entre los 10 clones analizados y el control Chandler micropropagado, observándose concordancia entre estos resultados y algunas de las características morfológicas evaluadas (número de foliolos por hoja); sin embargo, los cambios morfológicos observados, en ningún caso estuvieron asociados a alteraciones en el nivel de ploidía.



CAPÍTULO VI

Discusión

VI.1 Regeneración vía organogénesis adventicia en los cultivares de fresa Chandler y Carisma. Puesta a punto de un sistema eficiente de transformación genética en Carisma vía *Agrobacterium tumefaciens* y evaluación del material obtenido

El uso de herramientas biotecnológicas puede ser un complemento de interés para abordar la mejora de un determinado cultivo. En este trabajo, se han utilizado diferentes aproximaciones relacionadas con la regeneración *in vitro* y la transformación genética, para evaluar su utilidad en la mejora de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.).

VI.1.1 Regeneración de los cvs. Chandler y Carisma mediante organogénesis adventicia

Inicialmente, se abordó la puesta a punto de un protocolo de regeneración vía organogénesis adventicia, a partir de explantos de hoja, en el cultivar de fresa Chandler. Nuestros resultados muestran que, además de la presencia de citoquininas, el aporte de auxinas juega un papel clave en la diferenciación de brotes, dado que no se observó regeneración en ausencia de este regulador. Nehra y col. (1989) también señalan la importancia de la auxina en la regeneración de brotes de fresa, aunque ellos usaron AIA en lugar de AIB.

Por otra parte, la preincubación en condiciones de oscuridad, un tratamiento que parece disminuir la oxidación fenólica de los explantos (George, 1993), es clave en el proceso, tal y como observaron Liu y Sandford (1988) y Debnath (2006). Posteriormente, es necesaria la transferencia a condiciones de luz, aunque los requerimientos parecen ser genotipo dependientes; así, Nehra y col. (1989) recomiendan niveles bajos de

irradiancia ($12,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para el cultivar Redcoat mientras que, en nuestro caso, los mejores resultados se obtuvieron en el rango de 20–40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Estas diferencias podrían ser debidas a la interacción entre los reguladores de crecimiento y el nivel de irradiancia en el proceso de regeneración (Parthier y col., 1987). El sistema de regeneración puesto a punto en Chandler dió también buenos resultados en el cv. Carisma, obteniéndose tasas de regeneración superiores al 50%.

VI.1.2 Evaluación morfológica y agronómica de los regenerantes de Carisma

La ocurrencia de variación somaclonal está muy ligada al proceso de regeneración empleado. En nuestro caso, la mayoría de las líneas regenerantes de Carisma mostraron una superficie de la parte aérea inferior a la del control micropropagado; sin embargo, y contrariamente a estos resultados, Biswas y col. (2009) obtuvieron plantas de fresa mediante regeneración adventicia que mostraron un vigor superior al de las plantas control.

En relación con la longitud del peciolo, no se observaron grandes cambios en nuestros somaclones de Carisma, coincidiendo con observaciones previas de Youssef (2006) en los cultivares Sweet Charlie, Rosa Linda y Gaviota; sin embargo, Nehra y col. (1994), en el cultivar Redcoat, encontraron que las plantas propagadas in vitro tenían peciolsos significativamente más largos que las propagadas por estolones, mientras que en Veestar no había diferencias; por tanto, parece que el genotipo juega un papel relevante en este carácter.

Respecto a la capacidad de estolonado, aunque no se obtuvieron diferencias significativas para este parámetro entre las distintas líneas evaluadas, la mayoría de los somaclones estolonaron más que el control

micropropagado. Estos resultados no coinciden con los de Youssef (2006) en otros cultivares. Por su parte, Biswas y col. (2009) observaron una mayor producción de estolones en las plantas obtenidas a partir del cultivo de meristemos, frente a las obtenidas vía organogénesis adventicia. En cualquier caso, esta respuesta diferencial del cultivo *in vitro* sobre la capacidad de estolonado puede tener una base genética (Nehra y col., 1994).

En la mayoría de los casos, los variantes somaclonales no se han incluido en los programas de mejora, bien porque los genotipos obtenidos eran inferiores agronómicamente, o porque algunos de los cambios producidos no eran heredables (Karp, 1995). En nuestro caso, se obtuvieron somaclones muy variables en capacidad de fructificación (algunos clones fructificaban poco mientras que una línea mostró una producción superior al 150% de la obtenida en el control). Por su parte, Nehra y col. (1994) observaron que los cultivares de fresa Veestar y Redcoat respondieron de manera diferente a las distintas formas de regeneración *in vitro*: cultivo de meristemos, organogénesis adventicia indirecta (vía callo) u organogénesis directa a partir de disco de hoja. Así, en el cultivar Veestar no había diferencias ni en la capacidad de fructificación, ni en el tamaño de los frutos entre los diferentes métodos de regeneración; sin embargo, en Redcoat, las plantas procedentes del cultivo *in vitro* eran más precoces en floración y además, daban más frutos que las propagadas convencionalmente por estolones, siendo las que provenían de disco de hoja las más precoces, mientras que las que provenían de cultivo de meristemos dieron más flores y frutos. Por su parte, Youssef (2006) también obtuvo resultados variables en producción, si bien, en general, la fructificación obtenida en los clones regenerados vía adventicia fue inferior a la de los controles micropropagados.

En relación al tamaño del fruto, Nehra y col. (1994), en el cultivar Redcoat, observaron que no variaba significativamente entre los distintos

métodos de regeneración; sin embargo, en Carisma, sí obtuvimos diferencias significativas en el peso de los frutos de algunos clones con respecto al control micropropagado, aunque éste, en general, se mantuvo bajo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Youssef (2006) en regenerantes adventicios de Sweet Charlie, al producir frutos significativamente más pequeños que el control micropropagado, no ocurriendo lo mismo con los cultivares Rosa Linda y Gaviota.

La aparición de filodios en frutos maduros fue la tónica general en el cultivar Carisma, no encontrándose por otro lado, una relación clara entre la aparición de los mismos y las características de los somaclones en cuanto a producción o vigor de la planta. Otras deformaciones difíciles de catalogar aparecieron en frutos de algunos somaclones, todos ellos muy poco productivos. Es importante destacar que también en el control micropropagado de Carisma se observó la aparición de filodios en las plantas madres durante las dos primeras generaciones; además, también aparecieron otras deformidades con mayor intensidad al principio, disminuyendo progresivamente hasta desaparecer en la segunda generación vegetativa. Nuestros resultados contrastan con los de Nehra y col. (1994) quienes no encontraron anomalías fenotípicas durante el crecimiento en invernadero de las plantas propagadas *in vitro*, ya que sólo observaron amarillamiento de hojas en plantas procedentes del cultivo de meristemas y de callo, y, ocasionalmente, irregularidades en floración y hábito de crecimiento en plantas derivadas de callo.

VI.1.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* del cv. Carisma

Se abordó la transformación en Carisma a partir del protocolo desarrollado para el cultivar Chandler (Barceló y col., 1998), pero utilizando

como explanto la hoja completa que, en experimentos previos, había mostrado mayor capacidad de regeneración que el disco de hoja. En este protocolo, los explantos, procedentes de plantas micropropagadas en kinetina, fueron preincubados durante 10 días, antes de la infección con *A. tumefaciens*, en el medio de regeneración desarrollado previamente. Tras la infección y posterior co-cultivo, los explantos se transfirieron a medio de selección suplementado con 25 mg.l⁻¹ de kanamicina y un antibiótico bactericida.

Carbenicilina, cefotaxima y timentina, en el rango 100-500 mg.l⁻¹, son los antibióticos más frecuentemente utilizados para eliminar o inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* tras la infección de los explantos. Sin embargo, existen numerosos trabajos que muestran un efecto, positivo o negativo, de estos antibióticos en el proceso de regeneración debido a su posible actividad hormonal (Padilla y Burgos, 2010). En explantos de Carisma, el antibiótico más adecuado fue la timentina, obteniéndose una tasa de transformación del 17%, muy superior a la obtenida por Barceló y col. (1998) en el cv. Chandler, donde se utilizó carbenicilina como agente antibacteriano; por el contrario, en presencia de cefotaxima el porcentaje de transformación disminuyó hasta el 2%. Estos resultados confirman observaciones previas de Husaini (2010).

El riesgo de obtener quimeras durante la regeneración de los explantos inoculados con *A. tumefaciens* ha sido señalado en varias ocasiones (Monticelli y col., 2002; Chavali y col., 2003). En nuestros experimentos de transformación en Carisma, se siguió un procedimiento de selección progresiva dado que, en las primeras semanas tras la infección con *A. tumefaciens*, se observó que un pequeño porcentaje de brotes regenerados eran de naturaleza quimérica o falsos positivos. En este procedimiento, los brotes regenerados fueron aislados y micropropagados en presencia de 50 mg.l⁻¹ de kanamicina durante al menos 3 subcultivos. De esta forma, todas

las líneas que finalmente sobrevivieron a esta selección progresiva eran transgénicas, como lo demuestra la amplificación de un fragmento del gen *nptII* en ADN genómico aislado de hojas y el enraizamiento en presencia de kanamicina (25 mg.l⁻¹). En esta línea, Mathews y col. (1995) sugieren que la incapacidad para enraizar en presencia de kanamicina puede deberse a la presencia de una alta proporción de células no transformadas en los brotes obtenidos.

VI.1.4 Evaluación morfológica de las líneas transgénicas de Carisma

De manera similar a lo observado en el estudio previo del comportamiento agronómico de las líneas regenerantes de Carisma, se observó una gran variabilidad en el área de la planta entre las distintas líneas transgénicas independientes obtenidas, así como entre las distintas generaciones evaluadas; sin embargo, tan sólo una línea mostró un crecimiento significativamente menor que el control. Considerando los valores medios de todas las líneas transgénicas evaluadas, el área de planta fue un 87% del obtenido en las plantas micropropagadas. Un valor similar, 82%, se observó al comparar la media de todas las líneas de regeneración adventicia con respecto a su control micropropagado.

Respecto a la capacidad de producción, también se observó una gran variabilidad entre las distintas líneas y los controles, así como en su comportamiento a lo largo de las generaciones. No obstante, los resultados muestran como en la mayoría de ellas, junto al control macropropagado, la producción aumentó en la segunda generación vegetativa. Considerando la producción media durante las 3 generaciones evaluadas, 14 de los 20 clones transgénicos produjeron menos que el control micropropagado. Este valor fue muy similar al obtenido en las líneas regenerantes, donde 7 de las 16 líneas

fueron poco productivas. La disminución de la producción en las líneas transgénicas fue debida principalmente a una disminución en el peso medio del fruto. Nuestros resultados son similares a los descritos por Jiménez-Bermúdez (2005) en plantas transgénicas GUS del cv. Chandler, donde aproximadamente el 50% de las líneas transformadas produjeron menos que el control, obteniéndose incluso 2 líneas que apenas produjeron frutos. De acuerdo con esta autora, la disminución de producción en esas líneas transgénicas se puede achacar al proceso de regeneración adventicia *in vitro*.

Por otro lado, de manera similar a lo descrito para las líneas regenerantes, la aparición de filodios en frutos maduros de las líneas transgénicas de Carisma fue muy frecuente, observándose también en los frutos procedentes de los controles micro y macropropagados. Esto induce a pensar que su aparición puede estar ligada al propio genotipo más que al proceso de regeneración o transformación. Además, se observó una mayor aparición de los mismos al principio de la época de fructificación, lo cual podría indicar también una relación con la época del año y las condiciones ambientales (Ariza, 2009).

Otras anomalías, de carácter transitorio, observadas en frutos procedentes de clones con baja productividad y también en el control micropropagado, podrían ser consecuencia de variaciones temporales inducidas por el cultivo *in vitro* (Kaepler y col., 2000).

La inserción de un transgén en el genoma de una planta puede acarrear pérdidas o alteraciones en la expresión de otros genes, afectando al fenotipo y características de las plantas obtenidas (Oosumi y col. 2006; Miki y col., 2009). Globalmente, el análisis morfológico y agronómico de las líneas transgénicas de Carisma arrojó resultados similares a los descritos para las líneas de regeneración adventicia. Esto sugiere, por tanto, que la mayoría de las variaciones fenotípicas observadas no son debidas al proceso de inserción

de los transgenes, sino a variaciones ocurridas durante el proceso de regeneración adventicia.

El protocolo de transformación genética desarrollado en este trabajo permite la obtención de un elevado número de líneas transgénicas de manera eficiente lo que posibilitará la realización de estudios de genómica funcional en este cultivar. Sin embargo, dada la alta variabilidad fenotípica inducida por la regeneración *in vitro*, la utilización de la transformación genética para la mejora de este cultivar requiere obtener un número elevado de líneas transgénicas para elegir aquellas con características morfológicas y capacidad de producción similares al control.

VI.2 Caracterización del papel del gen *Fxacad1*, que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa, en el proceso de maduración del fruto de fresa

La fresa es un fruto no climatérico, con una vida postcosecha muy corta. El mantenimiento de la firmeza tras la recolección, es de crucial importancia para mantener el fruto en buen estado durante su almacenamiento y tiene gran importancia económica, tanto para el mercado de fruta fresca como en forma de procesado (Manning, 1998). En los últimos años, el análisis funcional de genes que codifican enzimas que actúan sobre los polímeros de la pared celular ha puesto de manifiesto el importante papel que tiene esta estructura en el reblandecimiento de la fresa (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; Quesada y col., 2009). La pared celular primaria está compuesta mayoritariamente por celulosa, hemicelulosa y pectinas. La pérdida de firmeza del fruto parece estar más relacionada con el desmantelamiento de las pectinas que con las fracciones de hemicelulosa o celulosa, ya que el

silenciamiento de genes pectinolíticos específicos de fruto, e.g. pectato liasa y poligalacturonasa, provoca una disminución del reblandecimiento (Posé y col., 2013; Posé y col., 2015), a diferencia de lo que ocurre tras el silenciamiento de genes de celulasa (Woolley y col., 2001; Palomer y col., 2006; Mercado y col., 2010).

La lignina es un componente mayoritario de la pared de tejidos lignificados. En algunos frutos carnosos, como el níspero, el incremento en la síntesis de lignina durante la maduración del fruto se ha relacionado con un incremento en la firmeza de la pulpa (Shan y col., 2008). En el fruto de fresa, la lignina está presente en los aquenios y en los haces vasculares que conectan los aquenios con la médula central (Suutarinen y col., 1998), y la cantidad de tejido vascular se ha asociado con la textura del fruto y la calidad de sus procesados (Jewel y col., 1973). Las enzimas cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y cinamil alcohol reductasa (CCR) tienen un papel clave en la ruta de biosíntesis de lignina. En fresa, Blanco-Portales y col. (2002) encontraron que el gen *Fxacad1*, que codifica una CAD, muestra una fuerte sobreexpresión durante la maduración del fruto. En estudios de expresión diferencial de genes relacionados con la maduración, en dos cultivares de fresa con distinto grado de firmeza de fruto, Salentjin y col. (2003) encontraron una correlación positiva entre firmeza de fruto y expresión del gen *Fxacad1*, mientras que lo contrario ocurrió con la expresión de un gen que codifica una CCR. Por lo general, en plantas mutantes o transgénicas deficientes en actividad CAD, se ha observado que la cantidad de lignina no varía pero sí su composición, siendo más rica en cinamil aldehídos. Salentjin y col. (2003) sugirieron, por tanto, que en el cultivar de fresa con frutos más blandos, los frutos tendrían una lignina más rica en aldehídos y más susceptible a la degradación enzimática, debido a una menor expresión del gen *Fxacad1* y mayor expresión de CCR. Recientemente, se ha observado

que el incremento en la firmeza de frutos de fresa en respuesta a la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* está relacionado con un incremento en la lignificación del tejido vascular del receptáculo agroinfiltrado (Yeh y col., 2014).

Para evaluar el papel del gen *Fxacad1* en la firmeza de la fresa, en este trabajo, se obtuvieron plantas transformadas con la secuencia del gen en sentido bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Para la transformación genética se utilizó el cv. Chandler puesto que este genotipo es el que se ha usado en todos los estudios previos de nuestro grupo relacionados con el análisis funcional de genes de pared celular. A pesar de que se transformó con el gen *Fxacad1* en sentido, sólo una de las líneas transgénicas obtenidas mostró una ligera sobreexpresión del gen, mientras que el resto mostró un alto grado de silenciamiento, que llegó incluso al 90%. Este fenómeno, denominado co-supresión, es relativamente frecuente cuando se utiliza el promotor constitutivo CaMV35S y se ha observado en este mismo cultivar al introducir un gen de pectato liasa en sentido (Youssef y col., 2009). Curiosamente, y a pesar del importante papel que juega la lignina en la rigidez mecánica de los tejidos, el alto grado de silenciamiento del gen *Fxacad1* no acarrió cambios importantes en los patrones de desarrollo de las plantas transgénicas obtenidas; en esta línea, plantas doble transgénicas CCR/CAD de tabaco, con menor contenido de lignina, también mostraron un fenotipo normal (Boudet, 2000).

No se observaron diferencias importantes en las características de los frutos de las líneas transformadas, a excepción de una ligera disminución del tamaño en alguna de ellas; sin embargo, esta disminución no se pudo correlacionar con el nivel de expresión del gen, por lo que parece un efecto asociado al propio proceso de regeneración *in vitro*. Por otra parte, Ring y col. (2013) observaron un incremento en la síntesis de lignina al inhibir la

chalcona sintasa, implicada en la síntesis de flavonoides, lo cual no es extraño si tenemos en cuenta que flavonoides y monolignoles (precursores de lignina) comparten el mismo precursor, p-coumaril-CoA; en nuestro caso, el silenciamiento del gen CAD no parece haber afectado los niveles de antocianos, ya que no se observaron diferencias significativas en el color de frutos transgénicos y control.

En general, la firmeza de los frutos transgénicos fue inferior a la de los controles, pero no se observó una correlación entre firmeza y expresión del gen, lo que parece indicar que ambos no están relacionados; por otra parte, la actividad CAD en fruto de fresa (Blanco-Portales y col., 2002) parece estar regulada por una pequeña familia génica, por lo que la pérdida de función del gen podría verse compensada por otro gen de esta familia. Esta falta de relación entre expresión de genes CAD y firmeza del fruto también ha sido observada en melocotón (Gabotti y col., 2015). Por otra parte, resultados preliminares de la composición de volátiles en alguna de las líneas transgénicas con *Fxacad1* silenciado mostraron un perfil de compuestos volátiles diferente del control. Estas diferencias podrían deberse a un efecto directo del silenciamiento del gen, confirmando observaciones previas de Mitchell y Jelenkovic (1995), quienes sugirieron que la actividad CAD podría intervenir en la formación de compuestos volátiles responsables del aroma de la fresa madura.

VI.3 Aislamiento y cultivo de protoplastos en el cultivar de fresa Chandler. Evaluación morfológica y agronómica de los protoclonos obtenidos y estabilidad genética

VI.3.1 Aislamiento y cultivo de protoplastos

Los protoplastos son una herramienta biotecnológica muy útil en los programas de mejora, por su capacidad para generar variabilidad genética. En fresa, son muy pocos los trabajos publicados en este campo (Wallin y col., 1993); además, tal y como ocurre en otras especies (Sadia, 2015), la respuesta obtenida es muy dependiente del genotipo. Por ello, en este trabajo se abordó la puesta a punto de esta tecnología en el cv. Chandler, tomando como base el trabajo de Nyman y Wallin (1989) en los cvs. Sengana y Canoga. Posteriormente, se evaluaron las características morfológicas y agronómicas de las plantas regeneradas.

Entre los factores que intervienen en el éxito de la respuesta, está el propio estado fisiológico del material de partida (Ortín Párraga y Burgos, 2003). Siguiendo las recomendaciones de Nyman y Wallin (1992), se indujo un estado hiperhídrico en nuestro material, de modo que mediante subcultivos en medio con alta citoquinina y baja sacarosa, se favorecía el crecimiento vegetativo frente al almacenaje de carbono en las paredes celulares (Nyman, 1993), facilitando la obtención de protoplastos.

El proceso de aislamiento en sí, supone un fuerte estrés para la viabilidad de los protoplastos (Papadakis y col., 2001; Papadakis y Roubelakis Angelaskis, 2002), no sólo por el proceso de la digestión enzimática en sí, sino también por las condiciones osmóticas requeridas a lo largo del proceso (Warren, 1991). En nuestro caso, un aumento en la proporción de sacarosa en el medio de lavado CPW al 21%, frente al 16% utilizado por Nyman y Wallin

(1988), permitió mejorar las tasas de obtención de protoplastos viables en un 13%. Por otra parte, la creación de un gradiente de densidad mediante una solución de percoll y sacarosa 0.4M, mejoró el aislamiento en un 10% al permitir recuperar una mayor población de protoplastos de diferentes densidades.

En la fase de cultivo, se utilizó una modificación del medio líquido 8p (Kao y Michayluk, 1975), previamente recomendada por Glimelius (1986) para fresa (Wallin, 1988, 1992), que incluye una disminución en la relación citoquinina/auxina frente a la formulación original. La inmersión de los protoplastos en agarosa inmediatamente después de su purificación, y la adición de medio líquido 8p transcurridos tres días, fue crucial para mejorar la viabilidad, probablemente, porque así se evitan problemas de toxicidad (Warren, 1991) por un lado, y por otro, se consigue evitar la agregación, así como estabilizar las membranas y disminuir la difusión de precursores de pared al medio de cultivo (Shillito y col., 1983; Chen y col., 1988).

La densidad óptima del cultivo depende del genotipo utilizado; así, mientras que Nyman y Wallin (1988, 1992) utilizaban una densidad de 5×10^4 protoplastos. ml^{-1} en los cultivares de fresa Sengana y Canoga, así como en la línea de mejora 77101, en Chandler, observamos que densidades superiores (10^5 y 2×10^5 protoplastos. ml^{-1}), aumentaban las divisiones celulares, al igual que ocurría en melocotón (Ortín Párraga y Burgos, 2003); este efecto beneficioso de la alta densidad parece estar relacionado con el proceso conocido como “acondicionamiento del medio” (Davey y col., 2005), al aumentar el contacto entre células.

Las necesidades nutricionales de los protoplastos a lo largo del proceso son muy dinámicas, variando con el crecimiento de los mismos (Davey y col., 2005). En este trabajo, las auxinas se redujeron 10 veces y las citoquininas se aumentaron al doble, en el medio de obtención de

microcallos, obteniéndose los mejores resultados (24% de regeneración) en las concentraciones más elevadas de benciladenina.

VI.3.2 Evaluación morfológica y agronómica de los protoclonos obtenidos y estabilidad genética

Durante el cultivo de los protoplastos, se pueden generar variaciones en el número y estructura de los cromosomas, siendo la variación somaclonal en plantas derivadas de protoplastos superior a la encontrada en plantas procedentes de explantos con alto grado de organización (Karp, 1993). Por otro lado, la poliploidización ha sido frecuentemente observada en plantas regeneradas a partir de protoplastos, asociándose normalmente a desequilibrios génicos, fluctuaciones cromosómicas, o incompatibilidades y fallos reproductivos (Chen, 2007). Las alteraciones morfológicas que aparecen están normalmente relacionadas con aumentos en el tamaño de órganos reproductivos y partes vegetativas de las plantas; así, Nyman y Wallin (1993) y Murti y col. (2012) observaron, en fresa, cómo incrementos en el nivel de ploidía producían aumentos en el grosor de hojas y peciolo, así como cambios en el color de las hojas y capacidad de floración. En este trabajo, también se encontró una gran variación en el color de las hojas entre los distintos protoclonos; sin embargo, las líneas evaluadas mediante citometría de flujo que presentaban estas alteraciones fueron todas octoploides.

El número de folíolos por hoja presentó una gran variabilidad; así, los protoclonos 2, 4, 8 y 11, pertenecientes al grupo más alejado del control, en base a los marcadores microsatélites utilizados, presentaron hojas con 4 y 5 folíolos; sin embargo, el control y los protoclonos 21, así como el 3, 9 y 26, pertenecientes a los dos grupos más próximos al control, tuvieron todas las hojas con tres folíolos. Sin embargo, no se observó correlación entre la frondosidad y capacidad de estolonado, con las distancias establecidas,

respecto al control, mediante marcadores microsatélites.

La producción obtenida en los protoclonos de Chandler fue muy variable; sin embargo, líneas con distinta producción mostraban idéntico nivel de ploidia o se incluían dentro del mismo grupo establecido mediante marcadores microsatélites. Si bien el número de líneas regeneradas donde se ha analizado la ploidia es bajo, los resultados obtenidos en el cultivar Chandler no coinciden con los obtenidos por Nyman y Wallin (1992, 1993) en otros cultivares; esto podría deberse al genotipo o al medio de cultivo, ya que estos autores utilizaban 2,4-D, auxina que favorece la aparición de individuos poliploides (Sunderland, 1977). Estas diferencias también se han observado en otras especies como patata; así, mientras que Sadia (2015) obtuvo cambios en el nivel de ploidía ligadas a alteraciones en el número de hojas, longitud de tallos, así como número y peso de tubérculos, Jones y col. (1989) no observaron cambios en el nivel de ploidía, aunque sí alteraciones morfológicas. La patata es una especie tetraploide y heterocigótica, como la fresa, habiéndose obtenido variantes somaclonales en diferentes caracteres, así como en resistencia a diversos patógenos (Nwauzoma y Jaja, 2013); por tanto, es esperable que la metodología desarrollada también pueda ser de utilidad en fresa.



CAPÍTULO VII

Conclusiones

VII. Conclusiones

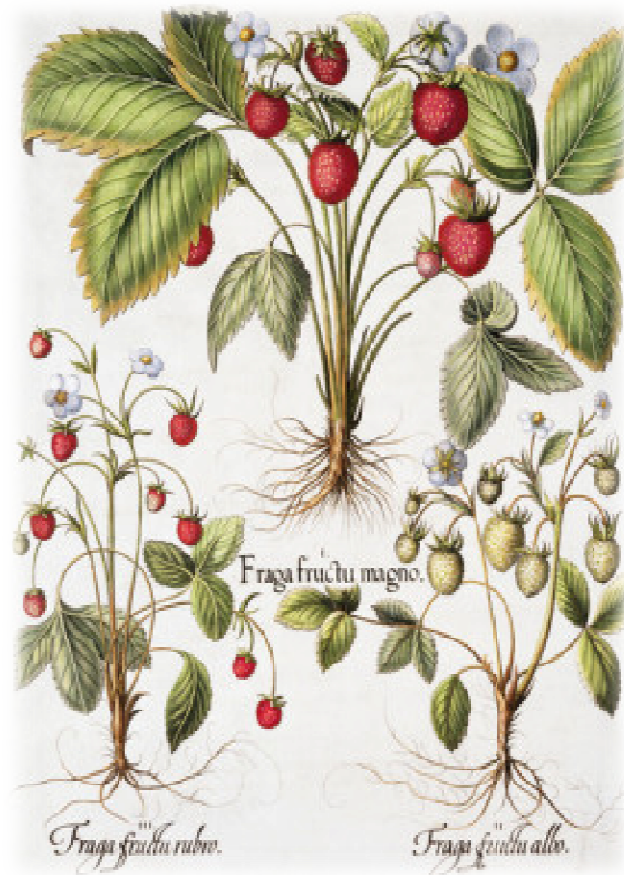
1. En el proceso de regeneración de fresa, via organogénesis adventicia, una relación adecuada citoquinina/auxina es crucial para la ocurrencia de morfogénesis. Además, los factores medioambientales (preincubación en oscuridad y transferencia a condiciones de iluminación moderada) juegan un papel esencial en el éxito del proceso.
2. El proceso de regeneración adventicia, en el cultivar de fresa Carisma, ocasiona una gran variabilidad en las plantas procedentes de distintos eventos de regeneración. En general, la mayoría de los somaclones tienen una superficie de la parte aérea inferior a la del control micropropagado y la capacidad de fructificación se ve disminuida en casi la mitad de las líneas regeneradas. En la mayoría de las líneas, el peso de fruto es inferior al control, observándose una alta correlación entre producción de los somaclones y peso de fruto.
3. En la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* del cv. Carisma, la elección de un antibiótico adecuado para controlar el crecimiento bacteriano, sin interferir en el proceso de regeneración, es esencial para el éxito de la transformación. En el caso de la fresa, el más adecuado es la timentina. Por otro lado, una selección progresiva en concentraciones crecientes de kanamicina es necesaria para eliminar plantas quiméricas que aparecen en las primeras fases de la transformación de este cultivar, al utilizar hojas completas como explanto.
4. La evaluación morfológica de distintas líneas transgénicas del cv. Carisma, en condiciones de confinamiento, ha permitido detectar grandes diferencias entre líneas. Esta variabilidad es de naturaleza similar a la

generada en plantas procedentes de distintos eventos de regeneración, por lo que las diferencias entre distintas líneas transgénicas de fresa parecen estar más relacionadas con el proceso de regeneración adventicia en sí, que con el proceso de transformación o de inserción del transgen. Estos resultados sugieren que, en los experimentos de transformación del cv. Carisma con genes de interés, es recomendable obtener un número elevado de líneas transgénicas para elegir aquellas con características morfológicas y capacidad de producción parecidas al control.

5. El silenciamiento del gen *Fxacad1*, que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa, en plantas de fresa mediante co-supresión, no afectó al crecimiento de la planta ni, en general, a la calidad de los frutos maduros en cuanto al peso, forma, color o sólidos solubles. En líneas con baja expresión del gen en fruto maduro, la firmeza de fruto fue ligeramente inferior al control, si bien no se encontró correlación entre el nivel de expresión del gen *Fxacad1* y la firmeza. Estos resultados sugieren que este gen no juega un papel relevante en la regulación de la firmeza del fruto de fresa; sin embargo, y dado que su expresión aumenta considerablemente durante la maduración, podría ser que interviniera en otros aspectos del proceso, como son los relacionados con el aroma.

6. La regeneración de plantas a partir de protoplastos de fresa es un proceso genotipo dependiente, en el que el estado fisiológico de la fuente de explantos y la calidad de los protoplastos obtenidos son factores críticos y, de hecho, juegan un papel más relevante que las propias condiciones de cultivo.

7. El proceso de regeneración a partir de protoplastos, en el cv. Chandler, conlleva la generación de una gran variabilidad en el material obtenido, fundamentalmente relacionada con la capacidad de fructificación. Además, aparecen otras diferencias agronómicas destacables en hábito de crecimiento, forma de frutos, capacidad de estolonado o número de folíolos en hoja, entre otros. Estas alteraciones no parecen requerir cambios en el nivel de ploidía, aunque los marcadores microsatélites sí permiten detectar cambios genéticos entre los distintos protoclonos. El número de folíolos por hoja es el marcador morfológico que guarda una correlación más estrecha con los grupos establecidos mediante el uso de los marcadores microsatélites.



CAPÍTULO VIII

Bibliografía

VIII. Bibliografía

- Andersen R., Kasperbauer M.J.** (1973). Chemical composition of tobacco leaves altered by near-ultraviolet and intensity of visible light. *Plant Physiology* 51:723-726.
- Andreu P., Arbeloa A., Terrén N., Marín J.A.** (2008). Isolation and culture of protoplasts from the plum rootstock "Marianna 2624" *Prunus cerasifera* Ehrh x *P.munsoniana* . W.Wight and Hedrick. *ITEA* 104 (4):482-492.
- Ariza Fernández M.T.** (2009). Deformación del fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.): causas y procesos afectados. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga. España.
- Asif M.H., Dhawan P., Nath P.** (2000) A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* 18:109-115.
- Atarés A., Moyano E., Morales B., Schleicher P., García-Abellán J.O., Antón T., García Sogo B., Perez Martín F., Lozano R., Borja Flores F., Moreno V., Bolarín M.C., Pineda B.** (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification an tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Report* 30 (10): 1865-1879.
- Bairu M.W., Aremu A.O.** (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63:147-173.
- Bairu W., Fennell C.W., Van Staden J.** (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AA cv. Zelig). *Scientia Horticulturae* 108:347-351.

Banks, M.S., Evans P.K. (1976). A comparison of the isolation and culture of mesophyll protoplasts from several *Nicotiana* species and their hybrids. *Plant Science Letters* 7(6):409-416.

Barceló M., El-Mansouri I., Mercado J.A, Quesada M.A., Pliego Alfaro F. (1998). Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:29-36.

Baucher M., Halpin C., Petit Conil M. (2003). Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38 (4): 305-350.

Benítez-Burraco A., Blanco-Portales R., Redondo-Nevado J., Bellido M.L., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J. (2003). Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* c.v. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* 54:633-645.

Bhojwani S.S., Dantu P.K. (2013). Parasexual Hybridization. En: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer. New Delhi, India.

Biswas M.K., Dutt M., Roy U.K., Islam R., Hossain M. (2009). Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae* 122:409-416.

Blanco-Portales R., Medina-Escobar N., López-Ráez J.A., González-Reyes J.A., Villalba J.M., Moyano E., y Muñoz-Blanco J. (2002). Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* 53 (375):1723-1734.

- Boudet A.M.** (2000). Lignins and lignification, selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:81-96.
- Boulay M.** (1985). Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières. *Annales AFOCEL* 1984:7-43.
- Brummell D.A., Harpster M.H.** (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47:311-340.
- Cai Ch., Xua Ch.J., Li X., Ferguson I., Chen K.S.** (2006). Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignification enzymes in loquat fruit flesh after harvest. *Postharvest Biology and Technology* 4:163-169.
- Carlberg I., Glimelius K., Eriksson T.** (1983). Improved culture ability of potato protoplasts by use of activated charcoal. *Plant Cell Reports* 2:223-225.
- Chandler S.F., Ragolsky E., Thorpe T.A.** (1987). Some morphogenic effects of sodium sulphate in tobacco callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 11:141-150.
- Chalavi V., Tabaeizadeh Z., Thibodeau P.** (2003) Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:747-753.
- Chen W.H., Davey M.R., Power J.B., Cocking E.C.** (1988). Sugarcane protoplasts: factors affecting division and plant regeneration. *Plant Cell Reports* 7:344-347.

- Chen Z.J.** (2007). Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58:377-406.
- Childers N.F.** (1980). The Strawberry Cultivars to Marketing. En: Childers N.F. (ed). Horticultural Publications, Gainesville, Florida.
- Chy Y.S., Philips G.C.** (1987). High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favourable for regeneration. *Plant Cell Reports* 6:105-108.
- Cordero de Mesa M., Jiménez-Bermúdez S., Pliego Alfaro F., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2000). *Agrobacterium* cells as microprojectile coating: A novel approach to enhance stable transformation rates in strawberry. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:1093-1100.
- Cumplido-Laso G., Medina-Puche L., Moyano E., Hoffmann T., Sinz Q., Ring L., Studart-Wittkowski C., Caballero J.L., Schwab W., Muñoz-Blanco J., Blanco-Portales R.** (2012) The fruit ripening-related gene FaAAT2 encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany* 63:4275-4290.
- Dale A., Sjulín T.M.** (1990). Few cytoplasms contribute to North American strawberry cultivars. *HortScience* 25:1341-1342.
- Darrow G.M.** (1966). Citado por Hummer K. E. y Hancock J. (2009). Strawberry Genomics: Botanical History, cultivation, traditional breeding and new technologies. En: Foltá K.M., Gardiner S.E. (eds). *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Plant Genetics and Genomics 6. Springer New York, pp: 413-435.

- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C.** (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23: 131-171.
- David A., David H., Mateille T.** (1982). *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles. *Physiologia Plantarum* 56:102-127.
- Debnath S.C.** (2005). Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41 (5): 671-676.
- Debnath S.C.** (2006). Zeatin overcomes thidiazuron-induced inhibition of shoot elongation and promotes rooting in strawberry cultures *in vitro*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81 (3):349-354.
- Debnath S.C., Texeira da Silva J.A.** (2007). Strawberry culture *in vitro*: applications in genetic transformation and biotechnology. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 1 (1), 1-12.
- El-Mansouri I.** (1997). Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Fragaria* spp. y *Lycopersicon esculentum* Mill. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga. España.
- El-Mansouri I., Mercado J.A., Valpuesta V., López-Aranda J.M., Pliego Alfaro F., Quesada M.A.** (1996). Shoot regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports* 15:642-646.
- El Quakfaoui S., Miki B.** (2005) The stability of the *Arabidopsis* transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes nptII and uidA. *Plant Journal* 41: 791-800.

- Emaldi U., Trujillo I., de Garcia E.** (2004). Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Willians. *Fruits* 59:257-263.
- Eriksson T. R.** (1988). Obstacles and perspectives in protoplast research. En: Puite K.J., Dons J.J.M., Huizing H.J., Kool A.J., Koornneef., Krens M., Krens F.A. (eds). *Progress in Plant Protoplast Research*. Springer. Netherlands, pp: 7-14.
- Evans D.A., Sharp W.R., Medina Filho H.P.** (1984). Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal Botany* 71:759-774.
- Faedi W., Mourgues F., Rosati C.** (2000). Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. *Acta Horticulturae* 567:51-59.
- Fasolo F., Zimmerman R.H., Fordham J.** (1989). Adventitious shoot formation on excised leaves of an *in vitro* grown apple cultivar. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16:75-87.
- Folta K.M., Dhingra A.** (2006). Transformation of strawberry: the basis for translational genomics in *Rosaceae*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42:482-490.
- Fridborg G., Eriksson T.** (1975). Partial reversal by cytokinin and (2-chloroethyl)-trimethyl-ammonium chloride of near-ultraviolet inhibited growth and morphogenesis in callus cultures. *Physiologia Plantarum*. 34:162-166.
- Gabotti D., Negrini N., Morgutti S., Nocito F.F., Cocucci M.** (2015). Cinnamyl alcohol dehydrogenases in the mesocarp of ripening fruit of *Prunus persica* genotypes with different flesh characteristics: changes in activity and protein and transcript levels. *Physiologia Plantarum* 154:329-348.

- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Geerts P., Hennequez A., Druart P.** (2009). Protoplasts electro-fusion technology as a tool for somatic hybridization between strawberries and raspberries. *Acta Horticulturae* 842:495-498.
- Gengenbach B.G., Umpeck P.** (1982). Characteristics of T-cytoplasm revertants from tissue culture. *Maize Genet Coop News Let.* 56: 140-142.
- George E.F.** (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology.* Exegetics Ltd., Edington, England.
- Gil Ariza D.J., Amaya I., López-Aranda J.M., Sánchez Sevilla J.F, Botella M.A., Valpuesta V.** (2009). Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence Tag-derived simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134 (2):1-11.
- Glimelius K., Djupsjobacka M., Felner-Feldegg H.** (1986). Selection and enrichment of plant protoplast heterokaryons of *Brassicaceae* by flow sorting. *Plant Science* 45:133-141.
- Graham J.** (2005). *Fragaria: strawberry.* En: Litz R.E. (ed). *Biotechnology of Fruit and Nut Crops.* CAB International Wallingford, Reino Unido, pp:456-474.
- Hancock J.F., Maas J.L., Shanks C.H., Breen P.J., Luby J.J.** (1992). Strawberries (*Fragaria*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290:491-548.
- Hanhineva K., Kokko H., Kärenlampi S.** (2005). Shoot regeneration from leaf

explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41:826-831.

Hannum S.M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (1):1-17.

Heinonen I.M., Meyer A.S., Frankel E.N. (1988). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4107-4112.

Hemphill R., Martin L.H. (1992). Microwave oven-drying method for determining soluble solids in strawberries. *HortScience* 27:1326.

Holford P., Newbury H. (1992). The effects of antibiotics and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Reports* 11:93-96.

Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messens E., Van Montagu M., Schell J. (1978). Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Molecular Genetics and Genomics* 163:181-187

Hummer K.E., Hancock J. (2009). Strawberry Genomics: Botanical history, cultivation, traditional breeding and new technologies. En: Folta K.M., Gardiner S.E. (eds). *Genetics and Genomics of Rosaceae* (6). Springer New York, pp:413-435.

Humphreys J.M., Chapple C. (2002). Rewriting the lignin road map. *Current Opinion in Plant Biology* 5:224-229.

- Husaini A.M.** (2010). Pre-and post-agroinfection strategies for efficient leaf disk transformation and regeneration of transgenic strawberry plants. *Plant Cell Reports* 29 (1):97-110.
- Husaini A. M., Mercado J. A., da Silva J. A. T., Schaart J. G.** (2011). Review of factors affecting organogenesis, somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of strawberry. *Genes, Genomes and Genomics* 5: 1-11.
- Infante R., Rosati P.** (1993). *Fragaria vesca* L. Alpine protoplast culture and regeneration. *Acta Horticulturae* 348:432-434.
- James D.J., Passey A.J., Barbara D.J.** (1990). *Agrobacterium* mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Science* 69:79-94.
- Jelenkovic G., Chin C., Billings S., Eberhardt J.** (1991). Transformation studies in cultivated strawberry, *Fragaria x ananassa* Duch. En: Dale A., Lubby J. (eds). *The Strawberry into the 21st Century, Proceedings of the Third North American Strawberry Conference*. Timber Press Portland, Oregon pp: 91-97.
- Jewell G.G., Rantsios A., Scholey J.** (1973) Factors influencing the breakdown of fruit in strawberry jam. *Journal of Texture Studies* 4(3):363-370
- Jiménez Bermúdez L.S.** (2005). Modificación de la textura del fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) mediante transformación con los genes de pectatoliasa, celulasa o poligalacturonasa en antisentido. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga. España.

- Jiménez Bermúdez S., Redondo-Nevado J., Muñoz Blanco J., Caballero J.L., López Aranda J.M., Valpuesta V., Pliego Alfaro F., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expresión of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* 128:751-759.
- Johansson L., Wallin A., Gedin A., Nyman A., Rettersson E., Svensson M.** (1988). Anther and protoplasts culture in apple and strawberry. *Vaextfoeraedling av Fukt och Baer* (5): 1986-1987.
- Jones O.P., Waller B.J., Beech M.G.** (1988). The production of strawberry plants from callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12:235-241.
- Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Rhee Y.** (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179-188.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M.** (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3954-3962.
- Kao K.N., Michayluk M.R.** (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105-110.
- Karimi M., Inze, D., Depicker, A.** (2002). Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7 (5):193-195.
- Karp A.** (1993). Mechanisms of somaclonal variation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 7(2): 20-25.

- Karp A.** (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures.
En: Vasil I.K, Thorpe T.A. (eds) Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 139-152.
- Karp A.** (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement.
Euphytica 85: 295-302.
- Larking P., Scowcroft W.** (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 60:197-214.
- Li Y.G., Stoutjestijk P.A., Larkin P.J.** (1999). Somatic hybridization for plant improvement. En: Soh W.Y., Bhojwani S.S. (eds). Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers, London, pp: 363-405.
- Litwinczuk W.** (2004). Field performance of Senga Sengana strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch) obtained by runners and in vitro through axillary and adventitious shoots. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Horticulture 7 (1).
- Liu Z.R., Sanford J.C.** (1988) Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. HortScience 23:1057-1059.
- Lunkenbein S., Salentijn E.M.J., Coiner H.A., Boone M.J., Krens F.A., Schwab W.** (2006). Up and downregulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase, impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. Journal of Experimental Botany 57:2445-2453.
- López Aranda J.M., Pliego Alfaro F., López Navidad I., Barceló Muñoz M.** (1994). Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in*

vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. Journal of Horticultural Science 69:625-637.

Maas J.L., Wang S.Y., Galletta G.J. (1996). Health enhancing properties of strawberry fruit. En: Pritts M.P., Chandler C.K., Crocker T.E. (eds). Proceedings of the IV North American Strawberry Conference. Orlando, Florida, pp: 11-18.

Mandal A., Maiti A., Chowdhury B., Elanchezhian R. (2001). Isoenzyme markers in varietal identification of banana. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 37:599-604.

Manning K. (1993). Soft fruit. Biochemistry of Fruit Ripening. En: Seymour G.B., Taylor J.E., Tucker G.A. (eds.). Springer, Netherlands pp: 347-378.

Manning K. (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. Planta 194:62-68.

Manning K., (1998). Isolation of a set of ripening related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. Planta 205 (4): 622-631.

Margara J. (1984). Bases de la multiplicación vegetativa. INRA. Versailles, Francia.

Marlett J.A. (2000). Changes in content and composition of dietary fiber in yellow onions and red delicious apples during commercial storage. Journal of AOAC International 83:992-996.

Martin-Cabrejas M.A., Waldron K.W., Selvendran R.R., Parker M.L. Moates G.K. (1994). Ripening-related changes in the cell walls of Spanish pear (*Pyrus communis*). Physiologia Plantarum 91:671-9.

- Marsal J.I., López-Aranda J.M, Medina J.J., López- Montero R., Arjona A., López-Medina J., Bartual Pastor R** (2000). Carisma: A new spanish strawberry cultivar. *Acta Horticulturae*. 567:187-189.
- Mathews H., Dewey V., Wagoner W., Bestwick R.K.** (1998). Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols. *Transgenic Research* 7(2): 123-129.
- Mathews H., Wagoner W., Kellog J., Bestwick R.** (1995). Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In vitro Cell and Development Biology-Plant* 31:36-43.
- Menczel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga P.** (1981). Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theoretical and Applied Genetics* 59 (3):191-195.
- Mercado J.A., El Mansouri I., Jiménez-Bermúdez S., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A.** (1999). A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35:152-153.
- Mercado J.A., Trainotti L., Jiménez-Bermúdez S., Santiago-Doménech N., Posé S., Donolli R., Barceló M., Casadoro G., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A.** (2010). Evaluation of the role of the endo- β -(1,4)-glucanase gene FaEG3 in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* 55:8-14.

- Metwally E.I., EL-Denary M.E., Dewir Y.H.** (2014). Influences of explant type and enzyme incubation on isolated protoplast density and viability in two garlic cultivars. *Pakistan Journal of Botany* 46:673-677.
- Meyers K.J., Watkins C.B., Pritts M.P., Liu R.H.** (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (23):6887-6892.
- Mitchell W.C., Jelenkovic G.** (1995). Characterizing NAD- and NADP-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 120(5):798-801.
- Micheltmore R., Marsh E., Seely S., Lauday B.** (1987). Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 6:439-442.
- Miki B., Abdeen A., Manabe Y., MacDonald P.** (2009). Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnology Journal* 7:211-218.
- Molina-Hidalgo F.J., Franco A.R., Villatoro C., Medina-Puche L., Mercado J.A., Hidalgo M.A., Monfort A., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Blanco-Portales R.** (2013) The strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *Journal of Experimental Botany* 64:1471-1483.
- Monticelli S., Gentile A., Damiano C.** (2002). Regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation in stipules of strawberry. *Acta Horticulturae* 567:105-107.

- Monticelli S., Meneghini M., Damiano C., Baruzzi G., Kondakova V., Watillon B.** (2004). Transgene environmental relationship in strawberry. *Acta Horticulturae* 708: 511-516.
- Moore, P.P., Robbins, J.A., Sjulín, T.M.** (1991). Field performance of olympus strawberry subclones. *HortScience* 26 (2):192-194.
- Morgan E.R.** (1999). Callus production from protoplasts of *Cyclamen persicum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:63-65.
- Morrow E.B., Darrow G.M.** (1952). Effects of limited inbreeding in strawberries. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 59: 269-276.
- Murashige T., Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murthy B.N.S., Singh R.P., Saxena P.K.** (1996). Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cultures. *Plant Cell Reports* 15 (6):423-426.
- Murti R.H., Kim H.Y., Yeoung Y.R.** (2012). Morphological and anatomical characters of ploidy mutants of strawberry. *International Journal of Agriculture and Biology* 14:204-210.
- Nehra N.S., Chibbar R.N., Kartha K.K., Datla R.S.S., Crosby W.L., Stushnoff C.** (1990a). *Agrobacterium* mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 9:10-13.
- Nehra N.S., Chibbar R.N., Kartha K.K., Datla R.S.S., Crosby W.L., Stushnoff C.** (1990b). Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Reports* 9:293-298.

Nehra N.S., Kartha K.K., Stushnoff C., Giles K.L. (1992). The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29:257-268.

Nehra N.S., Kartha, K.K., Stushnoff, C., Giles k.L. (1994). Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. *Euphytica* 76:107-115.

Nehra N.S., Stushnoff C., Kartha K.K. (1989). Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114:1014-1018.

Nehra N.S., Stushnoff C., Kartha, K.K. (1990c). Regeneration of plants from immature leaf derived callus of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Science* 66: 119-126.

Nwauzoma A.B., Jaja E.T. (2013). A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. *Journal of Applied Biosciences* 67:5252-5260.

Nyman M. (1993). Protoplast technology in strawberries. Ph.D. Thesis. Uppsala University, Sweden.

Nyman M., Wallin A. (1988). Plant regeneration from strawberry (*Fragaria x ananassa*) mesophyll protoplasts. *Journal of Plant Physiology* 133:375-377.

Nyman M., Wallin A. (1992a). Improved culture technique for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) protoplasts and the determination of DNA content in protoplast derived plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:127-133.

- Nyman M., Wallin A.** (1992b). Transient gene expression in strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*) protoplasts and the recovery of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11:105–108.
- Oka S., Ohyna K.** (1981). *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). *Canadian Journal of Botany* 59:68–74.
- Oosumi T., Gruszewski H.A., Blischak L.A., Baxter A.J., Wadl P.A., Shuman J.L., Veilleux R.E., Shulaev V.** (2006). High efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* 223:1219–1230.
- Ortín Párraga F., Burgos L.** (2003). Isolation and culture of mesophyll protoplasts from apricot. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78:624–628.
- Padilla I.M.G., Burgos L.** (2010). Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports* 29:1203–1213.
- Palomer X., Llop-Tous I., Vendrell M., Krens F.A., Schaart J.C., Boone M.J., van der Valk E., Salentijn E.M.J.** (2006). Antisense down-regulation of strawberry endo-B-(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science* 171:640–646.
- Palomo-Ríos E., Barceló-Muñoz A., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F.** (2012). Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109:201–211.

Papadakis A.K., Roubelakis Angelaskis K.A. (2002). Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* 40 (6):549-559

Papadakis A.K., Simis C.I., Roubelakis Angelaskis K.A. (2001). Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology* 126:434-444.

Parthier B., Lehmann J., Lerbs S., Lerbs W., Weidhase R.A., Wollgiehn R. (1987). Hormone and light actions in the differentiation program of chloroplasts. En: Fox J.E., Jacobs M. (eds). *Symposia on Molecular and Cellular Biology New Series*, 44. *Molecular Biology of Plant Growth Control*. Alan R. Liss, Inc, New York. pp: 391-400.

Passey A.J., Barret K.J., James D.J. (2003). Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explants types. *Plant Cell Reports* 21:397-401.

Pedersen S.B. (2001) Multiplex relative gene expression analysis by real-time RT-PCR using the Cycloer Q™ detection system. *BioRadiations* (BioRad) 107:10-11.

Pierik, R. L. M. (1987). In vitro culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Horticulturae* 226:25-40.

Pineda B., Giménez-Caminero, E., García-Sogo B., Antón M.T., Atarés A., Capel J., Lozano R., Angosto T., Moreno V. (2010). Genetic and physiological characterization of the *arlequin* insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 51 (3): 435-447.

- Posé S., Paniagua C., Cifuentes M., Blanco-Portales R., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2013). Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* 64:3803–3815.
- Posé S., Kirby A.R., Paniagua C., Waldron K.W., Morris V.J., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2015). The nanostructural characterization of strawberry pectins in pectate lyase or polygalacturonase silenced fruits elucidates their role in softening. *Carbohydrate Polymers* 132:134–145.
- Potrykus I.** (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Biology* 42 (1):205–225.
- Potrykus I., Shillito R.D.** (1986). Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. *Methods in Enzymology* 118: 549–578.
- Punja Z.K., Abbas N., Sarmento G.G., Tang F.A.** (1990). Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var *Hardwickii*, *C. melo* and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21 (2):93–102.
- Quesada M. A., Blanco-Portales R., Posé S., García-Gago J.A., Jiménez-Bermúdez S., Muñoz-Serrano A., Caballero J.L., Pliego Alfaro F., Mercado J.A. Muñoz-Blanco J.** (2009). Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology* 150 (2):1022–1032.
- Quesada M.A., Martín Pizarro C., García Gago J.A., Posé S., Santiago N., Sesmero R., Pliego Alfaro F., Mercado J.A.** (2007). Transgenic

strawberry: current status and future perspectives. *Transgenic Plant Journal* 1 (2):280-288.

Rani V., Raina S. (2000). Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 36:319-330.

Ring L., Yeh S.Y., Hücherig S., Hoffmann T., Blanco-Portales R., Fouche M., Hoffmann T., Blanco-Portales R., Fouche M., Villatoro C., Denoyes B., Monfort A., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Gershenson J., Schwab W. (2013). Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase *FaPRX27* in strawberry fruit. *Plant Physiology* 163:43-60.

Sadia B. (2015). Improved isolation and culture of protoplasts from *S. chacoense* and potato: morphological and cytological evaluation of protoplast-derived regenerants of potato cv. Desiree. *Pak. Journal of Agricultural Science* 52 (1):51-61.

Salentijn E.M., Aharoni A., Schaart J.G., Boone M.J., Krens F.A. (2003). Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* 118 (4):571-578.

Sansavini S., Rosati P., Gaggioli D., Toschi M.F. (1989). Inheritance and stability of somaclonal variations in micropropagated strawberry. *Acta Horticulturae* 280:375-384.

Scott D.H., Lawrence F.J. (1975). Strawberries. En: Janick, J. and Moore, J.N.(eds) *Advances in Fruit Breeding*. Prudue University Press. West Lafayette, Indiana, pp: 71-97.

- Schestibratov K.A., Dolgov S.V.** (2005) Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae* 106:177-189.
- Sesmero R., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2007). Antisense inhibition of pectate lyase gene expresión in strawberry fruit: characteristics of fruits processed into jam. *Journal of Food Engineering* 79:194-199.
- Sharma S., Bryan G., Winfield M., Millam S.** (2007). Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226:1449-1458.
- Shan L.L., Li X., Wang P., Cai Ch., Zhang B., Sun Ch.D., Zhang W.S., Xu Ch.J., Ferguson I., Chen K.S.** (2008). Characterization of cDNAs associated with lignification and their expression profiles in loquat fruit with different lignin accumulation. *Planta* 227:1243-1254.
- Shehata A. M., Wannarat W., Skirvin R. M., Norton M. A.** (2010). The dual role of carbenicillin in shoot regeneration and somatic embryogenesis of horseradish (*Armoracia rusticana*) *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102(3):397-402.
- Shillito D., Paszkowski J., Potrykus I.** (1983) Agarose plating and a bed type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Reports* 2:244-247.
- Singh A.K., Pandey S.N.** (2004). Genotypic variation among strawberry cultivars for shoot organogenesis. *Acta Horticulturae* 662:277-280.

- Singh R., Rastogi S, Dwivedi U.N.** (2010). Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (9):398-416.
- Sjulin T.M., Dale A.** (1987). Genetic Diversity of North American strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112:375-385.
- Sokal R.R., Rohlf F.J.** (1981) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* WH Freeman & Company, San Francisco.
- Sorvari S., Ulvinen S., Hietaranta T., Hiirsalmi** (1993). Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. *HortScience* 28 (1):55-57.
- Sun H., Lang Z., Zhu L., Huang D.** (2013). Optimized conditions for protoplast isolation from maize, wheat and rice leaves. *Chinese Journal of Biotechnology* 29:224-234.
- Sunderland N.** (1977). Nuclear cytology. En: H.E. Street (ed.). *Plant Tissue and Cell Culture.* Blackwell, Oxford, pp:177-205.
- Suutarinen J., Anakainen L., Autio K.** (1998). Comparison of light microscopy and spatially resolved Fourier transform infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell wall components of strawberries. *LWT Food Science and Technology* 31:595-01.
- Swartz H.J., Galleta G.J., Zimmerman R.H.** (1981). Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 106:667-673.
- Taiz L., Zeiger E.** (2010). *Plant Physiology Fifth Edition.* Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.

- Tang H., Zen R., Krczal G.** (2000). An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19:881-887.
- ur Rahman L., Ikenaga T., Kitamura Y.** (2004) Penicillin derivatives induce chemical structure-dependent root development, and application for plant transformation. *Plant Cell Reports* 22:668-677.
- Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M.** (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics* 220:245-250.
- Viejo M., Santamaría M.E., Rodríguez J.L., Valledor L., Meijón M., Pérez M., Pascual J., Hasbún R., Fernández Fraga M., Berdasco M., Toorop P.E., Cañal M.J., Rodríguez Fernández R.** (2012). Epigenetics, the role of DNA methylation in tree development. En: V. M. Loyola-Vargas y N. Ochoa Alejo (eds). *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology* 877. Springer, New York. pp 277-301.
- Waithaka K., Hildebrandt A.C., Dana M.N.** (1980). Hormonal control of strawberry axillary bud development in vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105 (3):428-430.
- Wallin A.** (1997). Somatic hybridization in *Fragaria*. *Acta Horticulturae* 439:63-66.
- Wallin A., Skjöldebrand H., Nyman M.,** (1993). Protoplasts as tools in *Fragaria* breeding. *Acta Horticulturae* 348:414-421.

- Wang D.Y, Wergin W.P, Zimmerman R.H.** (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *HortScience* 19:71-72.
- Wang H., Cao G., Prior R.L.** (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:701-705.
- Wang J., Ge H., Peng S., Zhang H., Chen P., Xu J.** (2004). Transformation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) with late embryogenesis abundant protein gene. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:735-738.
- Wang S. Y., Jiao H.** (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11):5677-5684.
- Warren G.** (1991). Protoplast Isolation and fusion. En: Stafford A. y Warren G (eds). *Plant Cell and Tissue Culture*. Open University Press, Buckingham.
- Wilhelm S., Sagen J.A.** (1974). Citado por Hummer K.E., Hancock J. (2009). Strawberry genomics: Botanical history, cultivation, traditional breeding and new technologies. En: Folta K.M., Gardiner S.E. (eds). *Genetics and Genomics of Rosaceae*. *Plant Genetics and Genomics* 6. Springer, New York, pp: 413-435.
- Woolley L.C., James D.J., Manning K.** (2001). Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, *cel1*. *Planta* 214:11-21.
- Wu J-H., Ferguson A.R., Murray B.G., Jis Y., Datson P.M., Zhang J.** (2012). Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany* 109: 169-179.

- Xu Z.H., Xue H.W.** (1999). Plant regeneration from cultured protoplasts. En: Soh W.Y., Bhojwani S.S. (eds). *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*. Springer, Netherlands, pp: 37-70.
- Yeh S.Y., Huang F.Ch., Hoffmann T., Mayershofer M., Schwab W.** (2014) FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Frontiers in Plant Science* 5:1-18.
- Yonghua P., Shanglong Z., Asghar S., Lingxiao Z., Qiaoping P., Kunsong C., Changjie X.** (2005). Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. *Plant Science* 168 (6):1425-1431.
- Youssef S.M.S., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F., Okasha Kh.A., Helal R.M., Gomaa H.M.** (2004). Studies on regeneration and transformation of cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Research Bulletin, Ain Shams University*:1-15.
- Youssef S.M.S.** (2007). Mejora biotecnológica de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.): I. Efecto del genotipo en la capacidad de regeneración. II. Transformación con genes que modifican las características del fruto. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga. España.
- Youssef S.M., Jiménez-Bermúdez S., Bellido M.L., Martín-Pizarro C., Barceló M., Abdal-Aziz S.A., Caballero J.L., López-Aranda J.M., Pliego-Alfaro F., Muñoz J., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2009). Fruit yield and quality of strawberry plants transformed with a fruit specific strawberry pectate lyase gene. *Scientia Horticulturae* 119:120-125.
- Zhong R., Morrison W.H., Negrel J., Ye Z.H.** (1998) Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell* 10:2033-2046.





Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler

Marta Barceló¹, Iman El-Mansouri², José A. Mercado¹, Miguel A. Quesada² & Fernando Pliego Alfaro^{2,*}

¹Centro de Investigación y Formación Agraria, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Churriana, Málaga; ²Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain (*requests for offprints)

Received 7 August 1997; accepted in revised form 20 May 1998

Key words: *Fragaria × ananassa*, plant transformation, regeneration, tissue culture

Abstract

The effects of growth regulator balance and culture conditions on the morphogenetic response of leaf disks from greenhouse grown plants of the strawberry cultivar Chandler, have been studied. Best results were obtained in the presence of 2.46 μM IBA and 8.88 μM BA, where 47% of the cultures regenerated after 16 weeks with 2.9 shoot colonies per regenerating leaf disk. Optimum incubation conditions included two weeks in the dark with subsequent transfer to light (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h). The regeneration protocol was also valuable when leaf disks from *in vitro* grown plants were used as explants. Transformation was attempted using *Agrobacterium tumefaciens* carrying the plasmid pBI121. Leaf disks from *in vitro* cultures proliferating in the presence of 2.21 μM kinetin were best explants for transformation. A 4.22% of inoculated explants showed kanamycin resistance after 16 weeks in a medium containing 25 mg l^{-1} of this antibiotic. The transgenic nature of several shoots was also confirmed by the GUS assay and PCR analysis.

Abbreviations: BA – benzyladenine; CaMV35S – cauliflower mosaic virus promoter; CTAB – hexadecyl trimethylammonium bromide; GUS – beta-glucuronidase (EC 3.2.1.31); IBA – indole-3-butyric acid; LB – Luria Broth base; LSD – least significant difference; NOS – nopaline synthase promoter; NPTII – neomycin phosphotransferase (EC 2.7.1.95); PCR – polymerase chain reaction

Introduction

Chandler is a strawberry cultivar with excellent traits and has been the leading cultivar grown in Spain during the last few years. It is being used as a main parental line in breeding programs; moreover, it is also a cultivar widely used in fruit processing (J.M. López-Aranda, CIFA, Málaga, 1997, pers. comm.). Genetic engineering of this valuable cultivar requires the development of transformation protocols and the establishment of efficient regeneration systems.

Previous studies on strawberry have clearly demonstrated the importance of various factors such as genotype (Liu and Sanford, 1988), type and source of explant (Nehra et al., 1989), hormonal balance and incubation conditions (Liu and Sanford, 1988; Nehra et

al., 1989) on successful regeneration via adventitious organogenesis. Genetic engineering of strawberry has already been reported (James et al., 1990; Nehra et al., 1990a,b); however, transformation frequencies are greatly influenced by the cultivar and the procedure used, e.g. 0.95% transformation frequency has been reported for the cultivar Rapella (James et al., 1990) and 6.5% for the cultivar Red Coat (Nehra et al., 1990b).

In this investigation, we have optimized a regeneration protocol for the strawberry cultivar Chandler; afterwards, we have attempted the transformation of the cultivar via *Agrobacterium tumefaciens* carrying the binary vector pBI121, which had given excellent results in transformation of *Fragaria vesca* (El-Mansouri et al., 1996).



Material and methods

Plant material and culture conditions

Leaf disks, 4×4 mm, with the adaxial surface in contact with the medium were used as explants. Leaf disks were obtained from virus-free plants of the Chandler cultivar growing in a greenhouse. Basal medium contained the macroelements of the N₃₀K mineral formulation (Margara, 1984) with MS microelements and vitamins (Murashige and Skoog, 1962). The pH of all media was adjusted to 5.7. Aliquots consisting of 25 ml of medium were distributed into 25×150 mm test tubes covered with polypropylene kaputs. All media were autoclaved for 15 min at 121 °C and 1.05 kg cm⁻². Except for dark treatments, standard culture conditions were 25 ± 1 °C temperature and a 16-h photoperiod under $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance provided by Sylvania Gro-lux lamps.

Experimental designs

The effect of growth regulator balance on the morphogenetic response was studied. The growth regulator combinations used were BA (0, 2.22, 4.44, 8.88, 17.76, 35.52 μM) and IBA (0, 2.46, 4.92 μM).

The influence of a darkness pre-treatment (1–4 weeks) on explant regeneration capacity was evaluated. Following the dark treatment, explants were transferred to light conditions ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16-h photoperiod). In this experiment, the basal medium was supplemented with 4.44 μM BA and 2.46 μM IBA.

The effects of different irradiance levels on regeneration, were also evaluated. All explants were preincubated for 2 weeks in the dark, and basal medium was supplemented with 4.44 μM BA and 2.46 μM IBA.

The effect of auxin (IBA vs. IAA at 2.46 μM) in combination with BA (8.88 μM) was studied. Leaf disks from *in vitro* plants proliferating in the medium of López-Aranda et al. (1994) were used as explants. In this experiment, explants were preincubated for 2 weeks in the dark.

Statistical analysis

In all regeneration experiments data were taken after 8 and 16 weeks. The number of regenerating disks as well as the number of colonies per regenerating leaf disk were evaluated. In the first experiment, data were taken throughout 6 subcultures at eight week intervals. At the end of each subculture, newly developed

shoot colonies were removed from the explant and the remaining tissue was transferred to new medium for further proliferation. Twenty explants were used per treatment and experiments were repeated twice. A randomized block design was used in all experiments. Arcsine transformation (Sokal and Rohlf, 1981) was applied to the percentages prior to mean separation by LSD.

Transformation

The *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 containing the non-oncogenic plasmid pAL 4404 and the binary vector pBI121 was used in transformation experiments. The pBI121 plasmid contains the NOS/NPTII gene for kanamycin resistance, and the CaMV35s/GUS chimaeric gene as reporter (Jefferson et al., 1987). The binary vector was mobilized into *Agrobacterium* by the freeze thaw method (Holsters et al., 1978). Bacteria were grown at 28 °C in LB medium containing 50 mg l⁻¹ kanamycin.

The kanamycin sensitivity of the explants was tested by culturing leaf explants on shoot regeneration medium containing filter sterilized kanamycin at 0, 10, 25 and 50 mg l⁻¹. Callus formation and shoot regeneration were scored after 3, 6 and 10 weeks of culture.

Three transformation assays were carried out. In the first one, the leaf disks were obtained from shoots with 4 subcultures, proliferating in the micropropagation medium of López-Aranda et al. (1994). In the second assay, leaves were obtained from shoots of 4-week-old seedlings, growing in MS medium (Murashige and Skoog, 1962). Seed germination was accomplished following the procedure of El-Mansouri et al. (1996) for *Fragaria vesca* seeds. Finally, in the third transformation assay, the leaf disks were obtained from stock cultures proliferating in a modified López-Aranda et al. (1994) micropropagation medium in which the only growth regulator used was kinetin at 2.21 μM .

In all cases, preculture of the leaf disks in the regeneration medium was used prior to *Agrobacterium* infection, 3 days in the first and second assays and 10 days in the third case. Incubation was accomplished on Petri dishes containing 25 ml of the optimum shoot regeneration medium, e.g., basal medium supplemented with 2.46 μM IBA and 8.88 μM BA. After this induction period, explants were placed in 50 ml tubes, inoculated with an overnight grown *Agrobacterium* culture diluted 1/10 in MS basal medium and gently

shaken for 20 min. The infected explants were blotted dry on sterile filter paper and cultivated on the shoot regeneration medium for 3 days. Explants were then transferred to a selection medium, the medium found optimal for shoot regeneration supplemented with 25 mg l⁻¹ kanamycin and 500 mg l⁻¹ carbenicillin.

In the three assays, shoots regenerated after 16–20 weeks were multiplied in the medium of López-Aranda et al. (1994) and rooted in MS basal medium, both media containing 25 mg l⁻¹ kanamycin. The absence of *Agrobacterium* contamination was shown by cultivation of leaf fragments of putative transformants on LB medium and by PCR amplification of a 437 bp fragment of the *VirD1* gene of the *Agrobacterium* genome (Lipp-Joao and Brown, 1993). GUS enzyme activity of transgenic shoots was determined by histochemical and fluorogenic assays as reported by Jefferson (1987). For DNA extraction, frozen leaf tissue (0.5 g) was ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen and washed with 5 ml of washing buffer (100 mM potassium acetate buffer pH 5.0, 20 mM EDTA, 1% PVP and 1% β -mercaptoethanol). After centrifugation at 3000 g for 5 min, the pellet was resuspended in 5 ml of extraction buffer (washing buffer supplemented with 1 mM NaCl, 1% N-laurylsarcosine and 1% CTAB). The extracts were incubated at 65 °C for 15 min followed by two extractions with chloroform. The DNA was precipitated with 1 volume of 100% ethanol and incubated at -20 °C for 15–30 min. The pellet was washed with 80% ethanol and allowed to dry briefly before being dissolved in 400 μ l of TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). Samples were treated with RNase for 1 h and extracted once with phenol and once with chloroform. Finally the DNA was precipitated with two volumes of 100% ethanol, washed with 80% ethanol, allowed to dry and dissolved in an appropriate volume of TE buffer. The DNA of the putative transformants was used to amplify the *nptII* gene by PCR according to Lipp-Joao and Brown (1993).

Results

Optimisation of regeneration in cultivar Chandler

The effect of the cytokinin/auxin ratio on regeneration is shown in Figure 1. The presence of auxin was absolutely necessary for regeneration to occur. No regeneration was observed when auxin was absent in the medium. Best results were obtained with 2.46 μ M

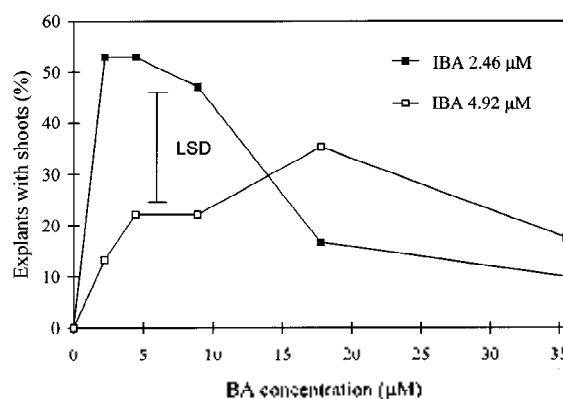


Figure 1. Effect of BA and IBA concentration (μ M) on regeneration percentage of leaf disks explants of the strawberry cultivar Chandler. Bar indicates the LSD value at $p = 0.05$.

IBA; higher concentrations (4.92 μ M) had negative effects on the process. As expected, BA was also required, with optimum levels being in the range 2.22–8.88 μ M. A relatively small percentage of leaf disks (5–15%) had started to regenerate after 8 weeks (data not shown) while after 16 weeks a greater number (around 50%) had formed colonies. Initially, the intermediate BA concentration (4.44 μ M) was chosen for use in further experiments, however, after 6 additional subcultures in the regeneration medium, the average number of colonies per regenerating disk was higher in the treatment including BA 8.88 μ M (2.9 colonies vs. 1.3 and 1.4 in the media containing BA 2.22 and 4.44 μ M, respectively). Thus, the highest BA concentration was chosen as standard and used to study the effect of auxin type, as well as on transformation assays.

Although no significant differences were observed in regeneration percentages after 16 weeks of culture, one to four weeks of dark incubation accelerated the regeneration process observed after 8 weeks and slightly increased the percentages of regeneration at 16 weeks, from 47% (no dark treatment) to a mean value of 68% after 1–4 weeks in the dark. No clear differences were detected in the number of colonies per regenerating leaf disk, which fluctuated in the range 1.5 (1 week darkness) to 2.6 (0 and 4 weeks darkness) after 16 weeks, however, shoots of the 2 weeks dark incubation had a better aspect than those of the other treatments, so the 2 weeks treatment was chosen as standard.

The effect of irradiance level is shown in Figure 2. Light significantly enhanced regeneration during the 0–16 week period, specially in the 20–40 μ mol m⁻² s⁻¹ range. The treatment of 40 μ mol m⁻² s⁻¹

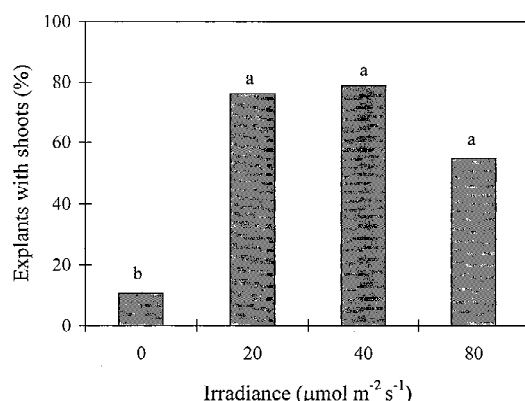


Figure 2. Effect of irradiance level on regeneration of leaf disks from the strawberry cultivar Chandler. Different letters within a column indicate significant differences at $p = 0.05$.

Table 1. Effect of kanamycin concentration on regeneration of leaf disks from the strawberry cultivar Chandler. Different letters within a column indicate significant differences at $p = 0.05$ by the LSD test

Kanamycin (mg l^{-1})	Weeks		
	3	6	10
	Regenerating explants (%)		
0	96.7a	100a	100a
10	43.4b	21.0b	0b
25	2.6c	0c	0b
50	0c	0c	0b

was chosen as standard because it gave the highest percentage of regenerating leaf disks, while no differences could be detected in the number of colonies per regenerating leaf disk, which fluctuated in the range 1.9–2.2.

No significant differences were detected between IAA and IBA on regeneration; however, the highest percentage 66.7%, was obtained at $2.46 \mu\text{M}$ IBA– $8.88 \mu\text{M}$ BA versus 58.30% in the presence of IAA-BA at equimolar concentrations. Thus, the former treatment was chosen as standard. The number of colonies per regenerating leaf disk was similar in both treatments.

The presence of kanamycin at 10 mg l^{-1} drastically decreased the organogenic capacity of leaf disks (Table 1). After 6 weeks, 100% disks remained viable in the absence of kanamycin, and only 21% remained viable at 10 mg l^{-1} kanamycin, but none showed signs of regeneration and they were dead after 10 weeks. At 25 mg l^{-1} all explants were dead after 6 weeks, so this concentration was chosen to select transformed plants.

Agrobacterium mediated transformation

Results obtained in the transformation assays are summarized in Table 2. In assay 1, using explants from shoots micropropagated in the medium of López-Aranda et al. (1994), which contained BA $1.46 \mu\text{M}$, IBA $4.92 \mu\text{M}$ and GA₃ $0.28 \mu\text{M}$, only two explants formed a compact callus which gave a positive response on the GUS assay, resulting in a potential 1.11% transformation frequency. By contrast, seedling-derived explants in the presence of kanamycin started to regenerate at a 4.16% frequency. Three shoots rooted in the presence of 25 mg l^{-1} kanamycin and two of these plants gave a positive response with the GUS assay (results not shown). In the third transformation assay, leaf disks from shoots proliferating in the presence of $2.21 \mu\text{M}$ kinetin were used. These leaves had a more normal aspect and a bigger size than those derived from shoots proliferating in the medium of López-Aranda et al. (1994). With this type of material and a 10 days preculture period, 12 colonies corresponding to independent transformation events were obtained after 16 weeks on selection medium. The transformation rate, based on kanamycin resistance, was 4.22%. Nine of these colonies were examined through the GUS assay, 4 of them gave a clear positive response and 2 of them showed a low GUS activity (Figure 3A). The presence of the *nptII* gene was confirmed by PCR in these 6 clones (Figure 3C). These amplification products were not the results of *Agrobacterium* contamination since no amplification of the *VirD1* gene was obtained with the same samples (Figure 3B). These transformed shoots displayed stable kanamycin resistance when multiplied through several subcultures in proliferation media supplemented with this antibiotic. Transgenic shoots were rooted in the presence of 25 mg l^{-1} kanamycin (Figure 3D) and acclimatized and gave rise to plants phenotypically identical to control plants (Figure 3E).

Discussion

Hormonal balance is a key factor in regulating morphogenesis in cultured explants (Murashige, 1974). Our results clearly show that in strawberry, auxins play a key role in shoot differentiation since virtually no regeneration was obtained in the absence of this growth regulator. Nehra et al. (1989) also emphasized the importance of auxin in strawberry shoot regeneration although they used IAA instead of IBA.

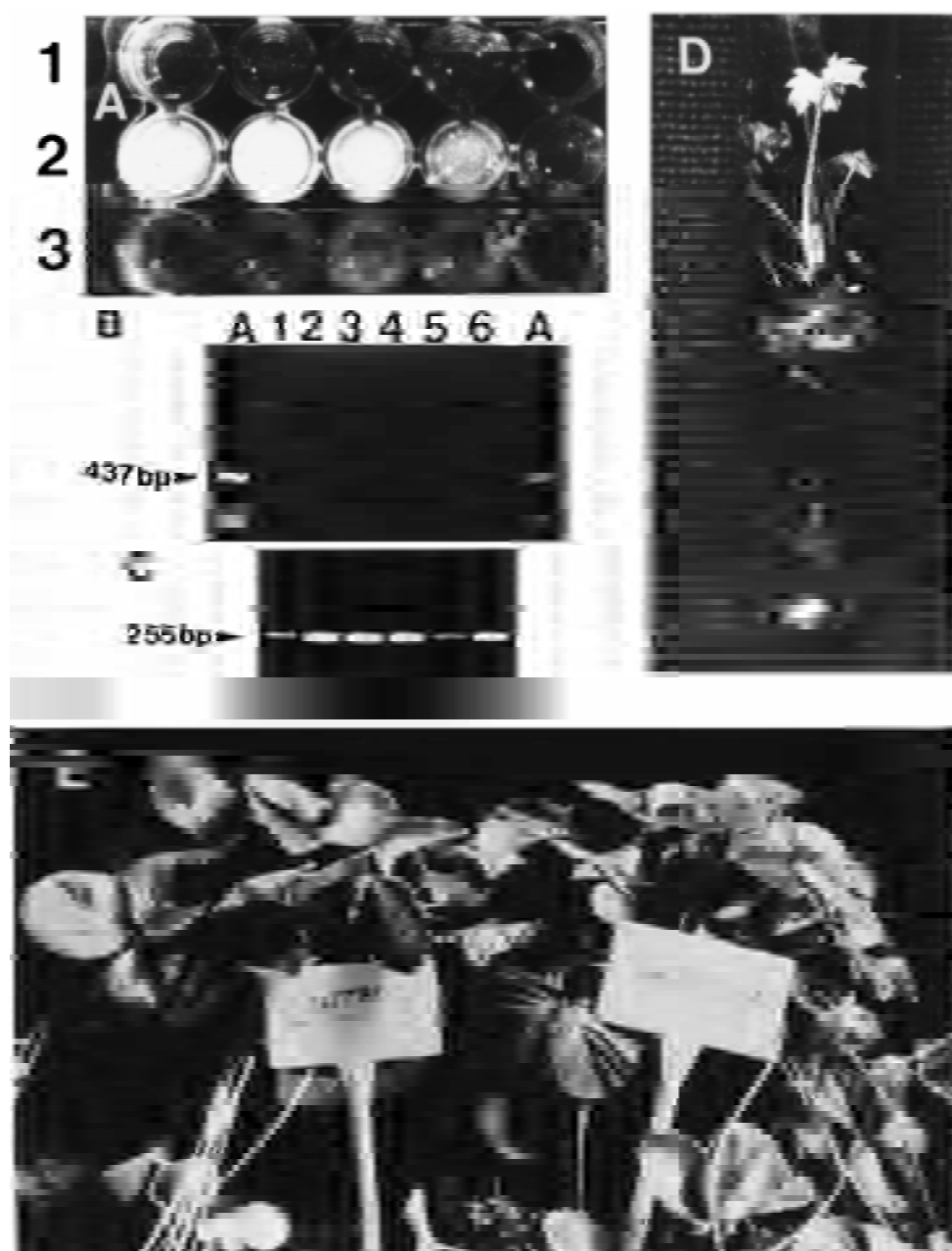


Figure 3. (A) Fluorogenic assay of the GUS activity. Row 1: extracts of control plants. Rows 2 and 3, extracts from putative transgenic plants. Each well represents an independent plant. The last wells (from left to right) on lines 1 and 3 were empty. On line 2, wells 1, 2, 3, and 4, were strongly GUS-positive, while the fifth was negative; on line 3, 3 and 4 were weakly positive while 1 and 2 were GUS-negative. (B) PCR amplification of the *VirD1* gene of *A. tumefaciens* electrophoresed on 2% agarose gel, arrow indicates the 437 base pairs (bp) fragment amplified. Lanes A correspond to the amplified DNA extracted from two independent *Agrobacterium* cultures. Lanes 1 to 6 correspond to DNA from the 6 putative independent transgenic plants that showed GUS activity. (C) PCR amplification of the *nptII* gene electrophoresed on 2% agarose gel; the arrow indicates the 255 bp fragment amplified in the same six transformants analysed in Figure 3B. (D) Transgenic shoot rooted in a medium with 25 mg l⁻¹ of kanamycin. (E) Acclimatized transgenic (right) and control (left) plants.

Table 2. Transformation frequency in explants of *Fragaria* × *ananassa* cv. Chandler after continuous selection on 25 mg l⁻¹ of kanamycin.

	Assay 1	Assay 2	Assay 3
Inoculated explants with <i>A. tumefaciens</i>	180	72	284
Number of explants resistant to kanamycin (prior to first subculture)	2	21	150
Morphogenetic response on transformed explants after 16 weeks of culture	2 calli	3 isolated plantlets	12 shoot colonies
Transformation frequency based on resistance to kanamycin (%)	1.11	4.16	4.22
Number of transgenic GUS positive	2 calli	2 plantlets	6 colonies*

* The transgenic nature of these 6 colonies was confirmed by PCR analysis.

Assay 1: Leaf explants obtained from adult shoots micropropagated in the López-Aranda et al. (1994) medium. Assay 2: Leaf pieces obtained from 4-week-old seedlings growing in MS medium. Assay 3: Leaf pieces obtained from adult shoots micropropagated in a modified López-Aranda et al. (1994) medium in which the only growth regulator used was kinetin at 2.21 μ M.

Our comparative studies between both auxins did not reveal significant differences, although slightly better results were obtained in the presence of IBA in accordance with previous observations of Liu and Sanford (1988). For a constant auxin level of 2.46 μ M, increasing BA concentration up to 8.88 μ M enhanced shoot colony formation. Moreover, this optimized exogenous cytokinin/auxin ratio allowed the maintenance of the shoot regeneration capacity through subculturing.

Preincubation in dark conditions has been shown to enhance morphogenesis in several genera, e.g., *Cucumis* (Punja et al., 1990), *Nicotiana* (Chandler et al., 1987) and *Malus* (Fasolo et al., 1989). This treatment seems to decrease phenolic exudation by explants (George, 1993). Our results agree with those of Liu and Sanford (1988) who also recommended a dark pre-treatment to enhance shoot regeneration in *Fragaria* × *ananassa*.

Morphogenesis is greatly enhanced by light especially at low-moderate (10–40 μ mol m⁻² s⁻¹) irradiances (Murashige, 1974), while higher irradiance levels could be inhibitory due to auxin inactivation (Fridborg and Eriksson, 1975) or to increased production of phenolic compounds (Andersen and Kasperbauer, 1973). In strawberry, Nehra et al. (1989) recommend low light levels (12.5 μ mol m⁻² s⁻¹) for shoot regeneration on the cultivar Redcoat; however, for Chandler, better results were obtained in the range 20–40 μ mol m⁻² s⁻¹ than at lower or higher irradiance levels.

In relation to explant origin, Liu and Sanford (1988) working with the Allstar cultivar, found different hormonal requirements for leaf tissues derived from *in vivo* or *in vitro* grown plants. In our case, no direct comparison between the two explant sources was made; however, results obtained in the regener-

ation medium optimized for leaf disks of greenhouse grown plants were similar to those obtained when leaf disks from micropropagated material were used. To avoid contamination problems on transformation experiments, leaf disks from *in vitro* grown shoots were used.

Several authors have shown the feasibility of transforming strawberry via *Agrobacterium tumefaciens*, (James et al., 1990; Jelenkovic et al., 1991; Mathews et al., 1995; Nehra et al., 1990a,b). In our case, application of the transformation protocol developed for *Fragaria vesca* (El-Mansouri et al., 1996) gave poor results in the Chandler cultivar when using explants from shoots cultivated in the López-Aranda et al. (1994) micropropagation medium, probably because *Fragaria vesca* regenerates at a faster rate and at a higher frequency than *Fragaria* × *ananassa*. However, use of leaf disks of juvenile origin gave much better results with 4.16% of transformants resulting. The higher regeneration potential of juvenile explants in relation to adult material is a well known phenomenon (Davies and Joiner, 1980; Raviv et al., 1987) and this could explain the observed transformation frequencies. Using explants of adult origin derived from shoots proliferating in a kinetin supplemented medium and extending the preculture period to 10 days gave also good results (4.22% transformation rate). Kinetin pretreatment of leaf explants also improves tomato transformation frequency (Chy and Philips, 1987). In the strawberry cultivars Jonsok and Hiku, Sorvari et al. (1993) showed that pretreatment of explant sources with BA (13.3 μ M) increased the organogenic response. In other species, e.g., *Pinus pinaster* (David et al., 1982) and *Morus alba* (Oka and Ohyna, 1981) similar results have been obtained. In our case, shoots

proliferating for 3–4 subcultures in the presence of BA were miniaturized and developed light hyperhydricity symptoms while those proliferating in the presence of kinetin had a much better aspect. Probably in the last case, the population of competent cells would increase and, as indicated by Potrykus (1991), this could result in the improved transformation rate. McHughen et al. (1989) and Hamza and Chupeau (1993) have also shown the importance of using an adequate preculture period for efficient transformation. Increasing the duration of the preculture period increased the proportion of competent cells and hence the probability that *Agrobacterium* would transfer its T-DNA (Nehra et al., 1990b). Obviously, there is a higher chance for escapes, but avoiding the use of antibiotics during early stages of organogenesis seems to be important, since they interfere with development, even of transformed cells (James et al., 1989; Michelmores et al., 1987). The culture of explants on selection medium just after co-culturing is convenient to avoid proliferation of non-transgenic sectors. The developed procedure allows a transformation frequency of 4.2% which makes it a valuable protocol to be used in any biotechnological approach for strawberry breeding involving this cultivar.

References

- Andersen R & Kasperbauer MJ (1973) Chemical composition of tobacco leaves altered by near-ultraviolet and intensity of visible light. *Plant Physiol.* 51: 723–726
- Chandler SF, Ragolsky E, Pua E & Thorpe TA (1987) Some morphogenic effects of sodium sulfate in tobacco callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 11: 141–150
- Chy Y-S & Philips GC (1987) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep.* 6: 105–108
- David A, David H & Mateille T (1982) *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles. *Physiol. Plant.* 56: 102–127
- Davies FT Jr & Joiner JN (1980) Growth regulator effects on adventitious root formation in leaf cuttings of juvenile and mature *Ficus pumila*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 91–95
- El-Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, López-Aranda JM, Pliego F & Quesada MA (1996) Shoot regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Rep.* 15: 642–646
- Fasolo F, Zimmerman RH & Fordham J (1989) Adventitious shoot formation on excised leaves of an *in vitro* grown apple cultivar. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16: 75–87
- Fridborg G & Eriksson T (1975) Partial reversal by cytokinin and (2-chloroethyl)-trimethyl-ammonium chloride of near-ultraviolet inhibited growth and morphogenesis in callus cultures. *Physiol. Plant.* 34: 162–166
- George EF (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington, England
- Hamza S & Chupeau Y (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp. Bot.* 269: 1837–1845
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M & Schell J (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163: 181–187
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ & Bevan MW (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila*) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep.* 7: 658–661
- James DJ, Passey AJ & Barbara DJ (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Sci.* 69: 79–94
- Jefferson RA (1987) Assaying chimaeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387–405
- Jefferson RA, Kavanagh TA & Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6(13): 3901–3907
- Jelenkovic G, Chin C, Billings S & Eberhardt J (1991) Transformation studies in cultivated strawberry, *Fragaria × ananassa* Duch. In: Dale A & Luby JJ (eds) *The Strawberry into the 21st Century*, Proceedings of the Third North American Strawberry Conference (pp 91–97). Houston, TX
- Lipp-Joao KH & Brown TA (1993) Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^r: pGSFR1161. *Plant Cell Rep.* 12: 422–425
- Liu ZR & Sanford JC (1988) Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *HortScience* 23: 1057–1059
- López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, López-Navidad I & Barceló-Muñoz M (1994) Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *J. Hort. Sci.* 69: 625–637
- Mathews H, Wagoner W, Kellog J & Bestwick R (1995) Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31: 36–43
- Margara J (1984) *Bases de la Multiplication Vegetative*. INRA. Versailles. Paris
- McHughen A, Jordan M & Feist G (1989) A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. *Plant Physiol.* 135: 245–248
- Michelmores R, Marsh E, Seely S & Lauday B (1987) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 6: 439–442
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135–166
- Nehra NS, Stushnoff C & Kartha KK (1989) Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(6): 1014–1018
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL & Stushnoff C (1990a) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep.* 9: 293–298
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL & Stushnoff C (1990b) *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 9: 10–13

- Oka S & Ohyna K (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Can. J. Bot. 59: 68–74
- Potrykus I (1991) Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol. 42: 205–225
- Punja ZK, Abbas N, Sarmento GG & Tang FA (1990) Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var *Hardwickii*, *C. melo* and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21: 93–102
- Raviv M, Reuveni O & Goldschmidt EE (1987) The physiological basis for loss of rootability with age in avocado seedlings. Tree Physiol. 3: 115–122
- Sokal RR & Rohlf FJ (1981) Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. WH Freeman & Company, San Francisco
- Sorvari S, Ulvinen S, Hietarante T & Hiirsalmi H (1993) Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. HortScience 28: 55–57



69

**SEPTIEMBRE
2014**

ACTAS DE HORTICULTURA

**Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de Ciencias Hortícolas**

VII CONGRESO DE MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS

ZARAGOZA 2014

**XIX Jornadas de Selección y Mejora
de Plantas Hortícolas**

VII Seminario de Mejora General Vegetal

Editores: José María Álvarez
Mayte Espiau
Ana Garcés
Cristina Mallor
María José Rubio
Rafael Socías i Company

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



**Zaragoza
16-18 de septiembre de 2014**

EVALUACIÓN DEL PAPEL DEL GEN *FXACAD*, QUE CODIFICA UNA CINAMIL ALCOHOL DESHIDROGENASA, EN EL REBLANDECIMIENTO DEL FRUTO DE FRESA

M. Barceló¹, J.A. García-Gago¹, R. Blanco-Portales², M.A. Quesada³, J. Muñoz-Blanco², F. Pliego-Alfaro³, J.A. Mercado³

¹ IFAPA Churriana, Junta de Andalucía, Málaga.

² Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.

³ Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC), Dep. Biología Vegetal, Universidad de Málaga.

Palabras clave: *Fragaria x ananassa*, frutos transgénicos, maduración de fruto, reblandecimiento de fruto

Resumen

El reblandecimiento de la fresa y las infecciones fúngicas son las principales causas de la pérdida de calidad de este fruto durante la maduración y postcosecha. El reblandecimiento del fruto se debe a la degradación de la pared celular y la disolución de la lámina media debido a la expresión de genes que codifican enzimas de pared. En frutos de fresa de variedades con distinto grado de firmeza, se observó una correlación positiva entre la expresión de un gen que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y la firmeza del fruto (Salentijn et al., 2003). Con el objetivo de determinar el papel de este gen en los cambios en textura que sufre la fresa, se han obtenido plantas transgénicas conteniendo una secuencia en sentido del gen *Fxcad*, que codifica una CAD que se induce durante la maduración. Durante el primer año, se analizaron en invernadero 25 líneas transgénicas independientes. La firmeza de fruto fue ligeramente inferior a la de frutos testigo en la mayoría de las líneas evaluadas. Los niveles de expresión del gen *Fxcad* se evaluaron en frutos rojos maduros de 11 líneas independientes. Tan sólo en una de ellas se observaron niveles de expresión mayores que en el control. Por el contrario, 7 de las líneas analizadas mostraron un silenciamiento del gen superior al 95%. Se seleccionaron 6 líneas independientes que mostraban distinto grado de expresión del gen *Fxcad* para su evaluación posterior durante dos años adicionales, obteniéndose resultados similares a los de la primera evaluación. Estos resultados sugieren que este gen tiene un papel menor en los cambios en textura del fruto durante la maduración.

INTRODUCCIÓN

La fresa se caracteriza por sufrir un reblandecimiento importante durante su maduración. La disminución de la firmeza del fruto se debe principalmente a la degradación de la pared celular por enzimas hidrolíticas codificadas por genes específicos de maduración. Sin embargo, otras proteínas pueden tener un papel importante. Así, en estudios de expresión génica en variedades de fresa con distinto grado de firmeza se observó que los genes que más variaban su expresión entre los cultivares estaban relacionados con la síntesis de lignina; la variedad más firme presentaba mayor expresión de un gen que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y menor expresión de un gen de cinamil alcohol reductasa (Salentijn et al., 2003). Estos resultados podrían estar relacionados con la composición de la lignina, siendo más rica en aldehídos y más susceptible a la degradación enzimática en el cultivar blando. Con el objetivo de evaluar el papel de la actividad CAD en la pérdida de firmeza del fruto de fresa se procedió a realizar un análisis funcional del gen *Fxcad*, que codifica una CAD que se induce durante la maduración del fruto, mediante su sobreexpresión en plantas de fresa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas transgénicas de fresa, cv. Chandler, se obtuvieron siguiendo el protocolo de Barceló et al. (1998). Tras su aclimatación, las plantas fueron transferidas al invernadero y propagadas vegetativamente. Se evaluó el peso, color, firmeza y sólidos solubles de frutos rojos maduros durante 3 años consecutivos. Los niveles de expresión del gen *Fxacad* en estos frutos se estimó mediante QRT-PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron más de 100 líneas transgénicas independientes de las cuales se seleccionaron 25 para su evaluación agronómica y molecular. La producción de frutos fue muy irregular dependiendo de la línea, obteniéndose muy pocos frutos en 7 de las líneas analizadas. El peso del fruto fue ligeramente inferior al de los frutos testigo en la mayoría de las líneas, no observándose diferencias significativas en el color y contenido en sólidos solubles. La firmeza de fruto fue ligeramente inferior a la de frutos testigo en la mayoría de las líneas transgénicas. Los niveles de expresión del gen *Fxacad* se evaluaron en frutos rojos de 11 líneas independientes mediante QRT-PCR. Tan sólo en una de las líneas se observaron niveles de expresión mayores que en el control sin transformar. Por el contrario, 7 de las líneas analizadas mostraron un importante silenciamiento del gen, mayor del 95%, debido probablemente a un fenómeno de co-supresión. Tras este primer año de evaluación, se seleccionaron 6 líneas que mostraban distinto grado de expresión del gen *Fxacad*. Estas líneas fueron evaluadas durante dos años adicionales, obteniéndose resultados similares a los del primer año.

Aunque la mayoría de las líneas analizadas mostraron una ligera disminución de la firmeza y niveles de expresión del gen *Fxacad* inferior al testigo sin transformar, los resultados obtenidos no mostraron una clara correlación entre la expresión de este gen y la textura del fruto. El gen *Fxacad*, por tanto, no parece tener un papel importante en el reblandecimiento. Sin embargo, dado que su expresión se induce notablemente durante la maduración, podría estar involucrado en otros aspectos de este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2010-00027-00-00, AGL2011-24814 y Fondos FEDER.

REFERENCIAS

- Barceló, M., El-Mansouri, I., Mercado, J.A., Quesada, M.A., Pliego-Alfaro, F. 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 54, 29-36.
- Salentjin E.M.J., Aarón, A., Schaart, J.G., Boone, M.J., Krens, F.A. 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiol. Plantarum* 118: 571-578.

